



Mariana Isabel Barbosa Cruz

ELEMENTOS VESTIGIAIS E CANCRO DO PULMÃO
Alterações nos níveis de elementos vestigiais no tecido pulmonar
resultantes do consumo de tabaco

Dissertação do 2.º Ciclo de estudos conducentes ao
grau de Mestre em Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Agostinho Almeida (FFUP) e
coorientação do Professor Doutor Agostinho Santos (FMUP e INMLCF)

Setembro 2014

DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

À Exma. Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, coordenadora do Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, muito obrigada pela disponibilidade, amabilidade, ajuda e compreensão no decorrer do ano letivo.

Ao Exmo. Professor Doutor Agostinho Almeida, orientador da presente dissertação, muito obrigada pela cooperação e disponibilidade, fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), Delegação do Norte (INMLCF), em especial à Dra. Diana Alves, Dra. Débora Lourenço, Dra. Maria Moura, Dr. Ricardo Mendes e Exmo. Prof. Doutor Agostinho Santos pela ajuda, colaboração e cooperação, tornando possível a realização do estudo aqui apresentado. Um obrigado especial à Amélia, pela enorme paciência e disponibilidade para as questões mais burocráticas.

Às colegas Patrícia Ramos e Anne-Sophie Alves, muito obrigada pela grande ajuda e preocupação. Muito obrigada mesmo.

Um obrigado muito especial ao João, pais, mano e Cláudia, pelo apoio e motivação constantes, por estarem sempre presentes.

Resumo

O cancro do pulmão é, de acordo com dados do GLOBOCAN 2012, um dos cancros com maior prevalência em todo o mundo e com maior índice de mortalidade também. Fatores de risco como hábito tabágico, exposição ocupacional, exposição ambiental e antecedentes pessoais de doenças respiratórias estão, com base em numerosos estudos, diretamente relacionados com o desenvolvimento da patologia. Fatores não menos importantes e também eles associados ao cancro do pulmão são o sexo, idade, etnia, antecedentes familiares, suscetibilidade genética e dieta alimentar.

Atendendo a que o tabagismo é o principal fator de risco para o cancro do pulmão, têm sido realizados muitos estudos no sentido de avaliar os efeitos na saúde humana das numerosas substâncias orgânicas presentes no fumo do tabaco, no sentido de perceber quais poderão ter maior significado etiológico. Menos estudado, sendo isso que motivou o presente trabalho, é o papel dos elementos vestigiais e a influência do consumo de tabaco na concentração desses elementos no tecido pulmonar.

Concretamente, o presente trabalho envolveu a determinação de um amplo painel de elementos vestigiais em amostras de tecido pulmonar e de cigarros das marcas mais vendidas em Portugal. Essencialmente pretendeu-se comparar os níveis de elementos vestigiais no tecido pulmonar de fumadores e não fumadores, de modo a: 1.º) verificar o impacto que o hábito de fumar tem a nível do tecido pulmonar no que se refere aos teores daqueles elementos; 2.º) avaliar o papel específico que os elementos vestigiais poderão ter no desenvolvimento das doenças pulmonares, e nomeadamente do cancro do pulmão.

Na população geral, os níveis de Al, Sr e Se no tecido pulmonar tenderam a aumentar com a idade, contrariamente ao que se observou com o Cd, que apresentou uma tendência para diminuir. Para os restantes elementos estudados (Mn, Fe, Ba, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Pb) não houve uma alteração significativa com a idade. As diferenças nos níveis de Al, Mn, Cd e Pb entre homens e mulheres mostraram-se estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Comparando o grupo de fumadores com os não-fumadores, observaram-se diferenças estatisticamente significativas (valores mais elevados nos fumadores) para o Al, Cd e Pb ($P < 0,05$). A análise dos cigarros e das cinzas resultantes da sua combustão mostrou que o tabaco é uma importante fonte de exposição a numerosos elementos vestigiais, justificando as diferenças observadas entre fumadores e não fumadores, e indicando que a presença de metais tóxicos no fumo do tabaco como seja o Cd e o Pb pode ter um importante papel na etiologia do cancro do pulmão.

Palavras-Chave: Cancro do pulmão, elementos vestigiais, tabaco, ICP-MS, análise postmortem de tecido pulmonar

Abstract

Lung cancer is, according to data from GLOBOCAN 2012, one of the cancers with highest prevalence in the world and with highest mortality rate also. Risk factors such as smoking habits, occupational and environmental exposures, and personal history of respiratory diseases are, based on numerous studies, directly related to the development of the pathology. Other important factors also associated with lung cancer are gender, age, ethnicity, family history, genetic susceptibility and dietary habits.

Considering that smoking is the main risk factor for lung cancer, many studies have been conducted to assess the effects on human health of the numerous organic substances present in tobacco smoke, in order to recognize which may have a greater etiological significance. Less studied, and this motivated the present work, is the role of trace elements and the influence of smoking on the levels of these elements in lung tissue.

Specifically, this study involved the determination of a broad panel of trace elements in samples of lung tissue and cigarettes more consumed in Portugal. Essentially the aim was to compare the levels of trace elements in lung tissue of smokers and non-smokers, in order to: 1) determine the impact that smoking has on trace elements in lung tissue; 2) assess the specific role that trace elements may have in the development of pulmonary diseases, particularly in lung cancer.

In the general population, the levels of Al, Sr and Se in the lung tissue tended to increase with age, in contrast with Cd, which showed a tendency to decrease. For the other elements studied (Mn, Fe, Ba, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Pb) no significant changes with age were observed. The differences in the Al, Mn, Cd and Pb levels between men and women were statistically significant ($P < 0.05$). Comparing the group of smokers with non-smokers, statistically significant differences we observed (higher values in smokers) for Al, Cd and Pb ($P < 0.05$). The analysis of cigarettes and ashes resulting from their combustion showed that tobacco is an important source of exposure to several trace elements, thereby justifying the differences observed between smokers and non-smokers, and indicating that the presence of toxic metals (e.g., Cd and Pb) in tobacco smoke can play an important role in the etiology of lung cancer.

Keywords: Lung cancer, trace elements, tobacco, ICP-MS, postmortem lung tissue analysis

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
<i>Abstract</i>	VI
1. Introdução	1
1.1. Considerações prévias	2
1.2. Cancro do pulmão.....	3
1.2.1. Epidemiologia.....	3
1.2.2. Fatores de risco	4
1.2.3. Carcinogénese	4
1.2.3.1 Stress oxidativo	7
1.3. Tabaco	10
1.3.1. Carcinogenicidade do tabaco	10
1.4. Elementos vestigiais	12
1.4.1. Definição / Classificação	12
1.4.2. Elementos vestigiais no pulmão	13
1.4.2.1. Considerações gerais	13
1.4.2.2. Revisão bibliográfica de estudos anteriores	15
1.4.3. Doseamento de elementos vestigiais	17
2. Objetivos	19
3. Parte experimental.....	22
3.1. Material, equipamentos e reagentes	23
3.2. Colheita de amostras	24
3.2.1 Tecido pulmonar.	24
3.2.2 Cigarros.	25
3.3. Pré-tratamento e solubilização de amostras.	25
3.3.1 Tecido pulmonar.	25
3.3.2 Cigarros.	26
3.3.3 Cinzas do cigarro.	26
3.4. Análise por ICP-MS.	27

4. Resultados e discussão	28
4.1. Elementos vestigiais nos cigarros.....	29
4.2. Elementos vestigiais nas cinzas do cigarro	33
4.3. Elementos vestigiais no tecido pulmonar	35
4.3.1 Homens vs. mulheres	35
4.3.2 Variações com a idade	37
4.3.3 Fumadores vs. não fumadores	39
5. Considerações finais / Conclusões	43
6. Bibliografia	45
Anexos	49
I – Registo da colheita de amostras.	49
II – Protocolo para a colheita de amostras.	50

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da relação entre a adição à nicotina e o cancro do pulmão por intermédio dos carcinogénicos presentes no fumo do tabaco e da sua capacidade indutora de mutações múltiplas nos genes críticos.....	5
Figura 2: Indutores da formação de espécies reativas de oxigénio, finalmente responsáveis por danos no ADN	8
Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigénio.	8
Figura 4: Representação dos principais componentes de um equipamento de ICP-MS.	18
Figura 5: Pulmão – indicação do local de recolha da amostra	25
Figura 6: Representação gráfica comparativa do teor ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos diferentes elementos vestigiais nos cigarros das várias marcas analisadas.....	30
Figura 7: Representação gráfica comparativa da concentração ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos elementos vestigiais nas cinzas dos cigarros das diferentes marcas.....	33
Figura 8: Representação gráfica dos teores ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar. Diferenças entre sexo masculino e sexo feminino	36
Figura 9: Representação gráfica dos teores ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar em função da idade	39
Figura 10: Representação gráfica dos teores ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar.Diferenças entre fumadores e não fumadores.	42

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais fatores de risco para cancro do pulmão	4
Tabela 2: Genes enzimáticos (fase I e fase II) com provável envolvimento na carcinogénese pulmonar.	6
Tabela 3: Materiais responsáveis por importante exposição ocupacional a agentes químicos, classificados pela IARC como “carcinogénicos para os humanos”.....	6
Tabela 4: Principais elementos vestigiais e sua essencialidade para os humanos.....	13
Tabela 5: Principais características, efeitos no organismo e concentração ($\mu\text{g/g}$) de diversos elementos vestigiais em cigarros reportadas em estudos anteriores	14
Tabela 6: Classificação dos elementos vestigiais de acordo com a IARC.....	15
Tabela 7: Caracterização da amostra do estudo	24
Tabela 8: Marcas de cigarros analisadas	25
Tabela 9: Condições de operação do forno de micro-ondas	26
Tabela 10: Condições de operação do ICP-MS	27
Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) obtidos na análise dos cigarros	29
Tabela 12: Estatística descritiva dos resultados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) obtidos na análise da cinza dos cigarros.....	33
Tabela 13: Percentagem da quantidade de elementos presente no cigarro que se volatiliza durante a sua combustão.....	34
Tabela 14: Estatística descritiva dos resultados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) obtidos na análise do tecido pulmonar	35
Tabela 15: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$ peso seco): a) Indivíduos do sexo masculino.....	35
Tabela 16: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$ peso seco): b) Indivíduos do sexo feminino	36

Tabela 17: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$ peso seco): c)	
Indivíduos fumadores	39

Tabela 18: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$ peso seco): d)	
Indivíduos não fumadores	40

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CYP – Citocromo

EAA – Espectrofotometria de absorção atômica

ETS – do inglês “*environmental tobacco smoke*” (fumo do tabaco ambiental)

GPx – Glutathione peroxidase

GST – Glutathione S-transferase

IARC – *International Agency for Research of Cancer*

ICP-MS – *Inductively coupled plasma-mass spectrometry*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

NAT – *N*-acetil-transferase

NNK – do inglês *nitrosaminoketone* (nitrosaminacetona)

PAHs – do inglês *polycyclic aromatic hydrocarbons* (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)

ROS – do inglês *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigénio)

SOD – Superóxido dismutase

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

O cancro do pulmão é a causa de morte por cancro mais comum entre homens e mulheres em todo o mundo. São vários os fatores de risco identificados no desenvolvimento da doença – consumo de tabaco, exposição ocupacional e exposição ambiental, dieta alimentar, sexo, idade, histórico familiar de doenças respiratórias, antecedentes pessoais de doenças respiratórias e suscetibilidade genética –, sendo que, de todos, o consumo de tabaco é considerado o mais importante, pelo bem conhecido potencial carcinogénico de muitas das substâncias presentes no fumo do cigarro.

A relação entre a exposição a estes fatores de risco e o desenvolvimento de doenças pulmonares, e em particular do cancro do pulmão, é, porém, quase sempre difícil de estabelecer, devido, em muitos casos, à impossibilidade de aceder a informação objetiva e fiável para os estudos.

A associação dos elementos vestigiais aos fatores de risco do cancro do pulmão tem-se revelado cada vez mais evidente. Os elementos vestigiais estão naturalmente presentes no meio ambiente, e a exposição humana pode acontecer através da alimentação, do consumo de água e do ar inalado. Muitos elementos vestigiais, em particular diversos elementos metálicos, apresentam elevada toxicidade, podendo causar dano celular e, consequentemente, o desenvolvimento de cancro.

O presente trabalho inseriu-se no contexto desta ampla temática: elementos vestigiais e cancro do pulmão. Concretamente, visou a determinação de um amplo leque de elementos vestigiais, incluindo os elementos de toxicidade mais bem reconhecida:

- a) em amostras de cigarro – no sentido de avaliar o seu teor neste produto;
- b) nas cinzas resultantes da queima dos cigarros – no sentido de, por diferença, avaliar a passagem dos referidos elementos vestigiais para o fumo do cigarro e, portanto, as quantidades potencialmente suscetíveis de inalação;
- c) em amostras de tecido pulmonar (de fumadores e não fumadores) – no sentido de identificar as “marcas” que o consumo de tabaco aí deixa em termos de níveis alterados de elementos vestigiais.

Atendendo a que o consumo do tabaco é considerado, como já foi referido, o principal fator de risco para cancro do pulmão, o presente trabalho teve como objetivo último ajudar a definir o papel dos elementos vestigiais no desenvolvimento daquela patologia.

Efetivamente,

- a) se se demonstrar que o tabaco possui importantes quantidades de elementos particularmente tóxicos/carcinogénicos,
- b) se se demonstrar que eles passam em quantidades significativas para o fumo do cigarro quando este é fumado,
- c) se se evidenciar a presença de níveis aumentados desses elementos no tecido pulmonar dos fumadores,

parece poder concluir-se que serão um dos responsáveis pelos bem conhecidos efeitos nefastos do fumo do tabaco no que respeita à saúde do trato respiratório e em especial ao desenvolvimento do cancro do pulmão.

1.2. CANCRO DO PULMÃO

1.2.1. Epidemiologia

O cancro do pulmão é um dos mais conhecidos (talvez o mais conhecido) tipo de cancro, bem como aquele que se encontra na origem do maior número de mortes por cancro, a nível mundial (1). Trata-se de um sério problema de saúde pública e, apesar de ser um dos tipos de cancro mais estudado, a sua incidência continua a aumentar (2). O diagnóstico tardio, resultado de uma sintomatologia pouco específica, é o principal responsável pelos elevados índices de mortalidade associados à doença (2).

O cancro do pulmão tem sido um dos cancros mais prevalentes na população mundial nas últimas décadas. No ano de 2008 estimaram-se cerca de 1,61 milhões de novos casos, representando 12,7% da totalidade de novos casos de cancro. Uma das principais características do cancro do pulmão reside na elevada taxa de mortalidade que lhe está associada: 1,38 milhões de mortes (ano), 18,2% do total (3).

Diferindo entre géneros, o cancro do pulmão apresenta maior incidência entre a população masculina com cerca de 1,1 milhões de casos (16,5% do total de cancros), versus 513.000 novos casos (8,5% do total) na população feminina. Mesmo assim, é um dos cancros mais comuns nas mulheres, ocupando a quarta posição a nível mundial, e é a segunda principal causa de morte por cancro (427.000 mortes, 12,8% do total de mortes por cancro) (3).

1.2.2. Fatores de Risco

Os fatores de risco mais associados ao cancro do pulmão são o tabaco, exposição ocupacional, poluição ambiental, dieta alimentar, sexo, idade, suscetibilidade genética, histórico familiar e antecedentes pessoais de doenças respiratórias, sendo que uns se denominam ‘extrínsecos’ (passíveis de sofrerem alterações) e outros ‘intrínsecos’ (inerentes ao indivíduo; que não podem ser alterados) (4).

Tabela 1: Principais fatores de risco para cancro do pulmão (4).

FATORES DE RISCO	
EXTRÍNSECOS	ÍNTRINSECOS
▪ Tabaco	▪ Sexo
▪ Exposição ocupacional	▪ Idade
▪ Poluição ambiental	▪ Raça
▪ Dieta alimentar	▪ Suscetibilidade genética
	▪ Histórico familiar
	▪ Antecedentes pessoais de doenças pulmonares

Dos fatores de risco mencionados na tabela 1, e no âmbito do presente trabalho, serão alvo de maior destaque os fatores de risco extrínsecos, nomeadamente “Tabaco” e “Exposição ocupacional/ambiental”, não só pelo facto de poderem ser, de alguma forma, evitados, moderados e/ou controlados mas também, e principalmente, pela sua comprovada importância.

1.2.3. Carcinogénese

O mais importante e bem conhecido fator de risco, diretamente relacionado com o cancro do pulmão, é, sem dúvida, o consumo de tabaco (2, 5, 6). Das mais de 7000 substâncias presentes no cigarro, 20 estão classificadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como “carcinogénicos para o humano ou animais” (7). Entre elas destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e a 4-(metilnitrosamino)-1-3-piridil)-1-butanona, também conhecida por “*nicotine-derived nitrosamine ketone*” (NNK), compostos de elevada carcinogenicidade que integram uma mistura composta por outros carcinogénicos, indutores tumorais e co-carcinogénicos presentes no cigarro (7, 8).

Os compostos carcinogénicos presentes no fumo do cigarro estabelecem a ponte entre a adição à nicotina e o cancro do pulmão, uma vez que é desta adição que resulta a constante vontade e continuidade do ato de fumar (9). Contudo, a nicotina não é, por si só, considerada cancerígena.

Substâncias carcinogénicas como os PAHs e a NNK requerem ativação metabólica para exercerem a sua carcinogenicidade e, na tentativa de contrabalançar este efeito, o organismo responde com um processo de destoxificação. O balanço entre os processos de ativação metabólica e destoxificação difere entre indivíduos, acabando por interferir no risco individual de desenvolverem cancro (10).

No seguimento da ativação metabólica formam-se adutos¹ de ácido desoxirribonucleico (ADN), os quais, por sua vez, quando escapam ao mecanismo de reparação celular, e persistem, resultam numa codificação errada e consequente mutação de genes, denominados genes críticos ou oncogenes², evoluindo para cancro. As células cujo ADN se encontra danificado são removidas por apoptose³ ou morte programada (11, 12).

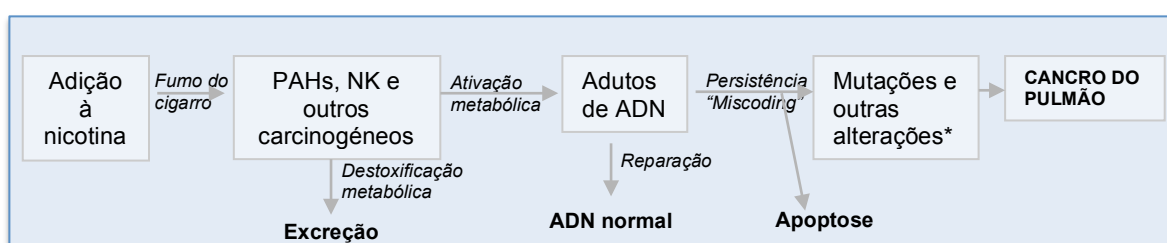


Figura 1: Representação esquemática da relação entre a adição à nicotina e o cancro do pulmão por intermédio dos carcinogénicos presentes no fumo do tabaco e da sua capacidade indutora de mutações múltiplas nos genes críticos. *Nota: em “outras alterações” estão incluídas alterações nos genes RAS, MYC, p53, p16, RB, FHIT e outro genes “críticos”. Extraído de (10).

Aquando da exposição aos compostos carcinogénicos do tabaco, o organismo converte-os, mediante reações enzimáticas, em metabolitos que possam ser mais rapidamente excretados. Este processo decorre em duas etapas (“fases”): na primeira, por ação da enzima citocromo P450 (13) e restantes sistemas enzimáticos pertencentes a esta família (CYPs); na segunda, através das enzimas glutathione S-transferase (GST) e *N*-acetil-transferase (NAT). As enzimas de fase I convertem os compostos exógenos em substâncias reativas, capazes de se ligarem ao ADN, o que favorece o aparecimento de mutações. As enzimas de fase II facilitam a eliminação dos compostos ativados, por conjugação ou outras transformações que levem ao aumento da hidrossolubilidade dos mesmos (2).

¹ **Aduto:** molécula resultante da formação de uma ligação covalente entre uma espécie eletrófila (por exemplo epóxidos) e um dos centros nucleófilos do ADN (como átomos de oxigénio ou azoto).

² **Genes “críticos” ou “oncogenes”:** genes como o *KRAS* (promove a proliferação celular) e o gene supressor tumoral *TP53* (codifica proteínas com a função de evitarem divisões celulares inapropriadas) que, quando sujeitos a mutações em regiões críticas, perdem a capacidade de manterem a normalidade no mecanismo de crescimento celular, de que resulta a carcinogénese.

³ **Apoptose:** processo de morte celular programada ou “autodestruição celular programada”. Pode ser desencadeada por danos no ADN, levando à eliminação de células anormais.

Tabela 2: Genes enzimáticos (fase I e fase II) com provável envolvimento na carcinogénese pulmonar.

Enzimas Fase I	Ref. ^a	Enzimas Fase II	Ref. ^a
CYP1A1	(14)	GSTM1	(21, 22)
CYP2D6	(15)	GSTT1	(22, 23)
CYP2A6	(16)	GSTP	(24)
CYP2C9	(17)		
CYP3A4	(18)		
CYP2E1	(19, 20)		

Alguns autores afirmam que o risco de desenvolver cancro do pulmão diminui significativamente após cessação tabágica. Porém, só 5 anos após a cessação é que se faz sentir aquela diminuição, sendo que nunca se atinge o nível de risco de um não-fumador (6).

A exposição ocupacional é outro fator de risco de grande importância. Trabalhadores expostos diariamente a substâncias como o amianto (ou *asbestos*), metais (níquel, arsénio, cádmio, entre outros), rádio e radiações apresentam um risco aumentado de vir a desenvolver cancro pulmonar (25). Deve destacar-se ainda a sinergia que parece existir entre o efeito produzido por alguns destes agentes, principalmente o amianto, o arsénio e o rádio, e o tabaco (26, 27).

Tabela 3: Materiais responsáveis por importante exposição ocupacional a agentes químicos, classificados pela IARC como “carcinogénicos para os humanos”. Baseado em (28).

MATERIAL	AGENTES (IARC Grupo 1)
Vidro, metais, pesticidas	Arsénio e seus compostos
Materiais de isolamento, filtração, têxtil	Amianto
Materiais para aeronaves	Berílio e seus compostos
Intermediários químicos, subprodutos	Éter clorometílico e bis-(clorometil) éter
Fabrico de pigmentos/tingimento	Cádmio e seus compostos
Metalização	Crómio (VI)
Materiais de construção	Hidrocarbonetos aromáticos
Combustíveis (carvão de hulha/betuminoso)	Hidrocarbonetos aromáticos
Ligas e catalisadores (metalurgia)	Compostos de níquel
Papel, tintas, pigmentos	Fibras de amianto
Plásticos	Cloroeteno

A população está continuamente exposta a fatores de risco – nomeadamente ambientais – tendo ou não conhecimento do seu grau de carcinogenicidade (29). A compreensão do risco de cancro associado à exposição ocupacional bem como ao estilo de vida de uma população torna possível estabelecer medidas preventivas, contribuindo para a diminuição da incidência do cancro do pulmão (30).

De seguida, enumeram-se algumas dessas estratégias preventivas, com vista a uma redução da incidência e mortalidade do cancro do pulmão (30, 31):

- 1) Ações de sensibilização para alterar hábitos comportamentais da população, a começar pela população mais jovem, através de intervenções nas escolas;
- 2) Disseminação de estratégias para cessação dos hábitos tabágicos, nas quais estejam envolvidos profissionais de saúde, para um melhor acompanhamento do processo;
- 3) Aumento do preço do tabaco, com aplicação de taxas que reverterão a favor de intervenções comunitárias;
- 4) Conceção de estudos que permitam desenvolver instrumentos de diagnóstico mais eficazes, em especial capazes de permitirem um diagnóstico mais precoce, reduzindo o índice de mortalidade da doença e os elevados custos despendidos no seu tratamento;
- 5) Investigação básica na área da genética, com vista a determinar a pré-disposição individual para a adição à nicotina, bem como para o hábito de fumar, para que se possam desenvolver estratégias específicas de prevenção.

1.2.3.1. Stress oxidativo

O grande aumento da incidência de cancro verificado nas últimas décadas deve-se em grande parte a dois fatores: envelhecimento da população e disseminação de agentes carcinogénicos, presentes não apenas em determinados ambientes ocupacionais, mas também no meio ambiente em geral (29).

Sucintamente, o stress oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e a capacidade que o organismo tem de rapidamente eliminar essas espécies reativas ou de reparar o dano por elas provocado (29). O dano provocado no ADN das células e outras estruturas (e.g. membranas), face a um mecanismo de reparação celular ineficaz, leva a envelhecimento e apoptose celular prematuros. Compreende, desta forma, o importante papel das ROS e os consequentes danos no ADN que levam à carcinogénese (29).

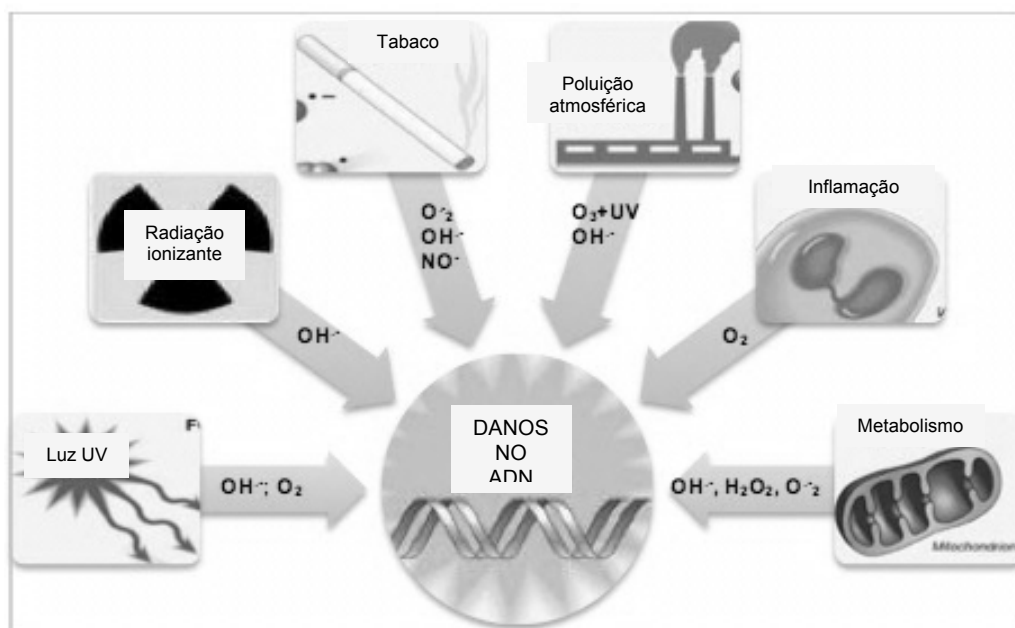


Figura 2: Indutores da formação de espécies reativas de oxigênio, finalmente responsáveis por danos no ADN.

Alguma literatura descreve a origem do cancro numa única célula, que evolui para célula cancerígena após sofrer mutações em genes “críticos” (*RAS*, *p53*, *LMYC*), como resultado de erros sucessivos e aleatórios na replicação do ADN ou pela reação do ADN com radicais livres ou outras espécies químicas de origem endógena e/ou exógena (29).

O fumo do cigarro induz um processo inflamatório crónico das vias respiratórias, com acumulação e ativação leucocitária, resultando na formação de ROS (32, 33). Além disso, o fumo do cigarro contém níveis elevados de radicais livres capazes de provocar danos no ADN e gerar bases oxidadas, por exemplo a 8-oxo-dG, um marcador típico de dano oxidativo no ADN (29). Nestas circunstâncias, o pulmão, exposto a elevadas concentrações de oxigênio, apresenta uma maior predisposição para lesões causadas pelas ROS. Como mecanismo de defesa, o tecido pulmonar possui substâncias antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

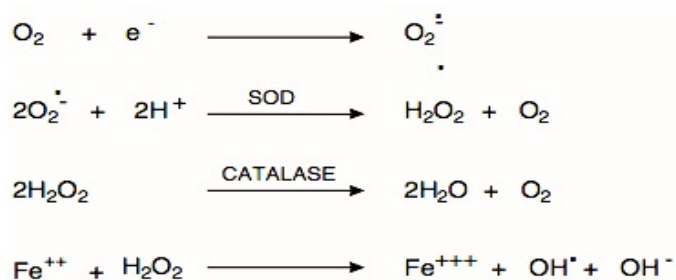


Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de (34)

Desta forma, um desequilíbrio na atividade das espécies oxidantes e antioxidantes no tecido pulmonar pode resultar em stress oxidativo (35). E em última instância, a produção excessiva ou inapropriada de ROS endógenas e/ou a exposição a ROS exógenas pode estar implicada no processo de carcinogénese pulmonar (36-38). Outras espécies, radicais livres, são também conhecidos agentes mutagénicos, sendo responsáveis por modificações genéticas envolvidas na origem do cancro (39).

1.3. TABACO

Como já foi destacado, o consumo de tabaco, e mais concretamente a inalação do fumo resultante da queima do cigarro, é considerado o fator com maior responsabilidade na origem de doenças pulmonares, nomeadamente do cancro do pulmão. A toxicidade de algumas substâncias presentes no fumo do cigarro constitui uma enorme ameaça para a saúde humana, não só dos fumadores, devido à inalação direta do fumo, mas também de não-fumadores, devido à inevitável exposição ao fumo que também sofrem (40).

Neste contexto, o fumo resultante da queima de produtos tabágicos (cigarros, cigarrilhas, em cachimbo, entre outros) é dividido em duas categorias: (i) '*mainstream smoke*', que corresponde ao fumo diretamente inalado pelo fumador, considerado um forte indutor tumoral (41, 42); (ii) '*sidestream smoke*', o qual representa o fumo emitido para o ambiente, sob a forma de aerossol (43, 44), contribuindo para a poluição ambiental com origem no fumo do tabaco e seus componentes, habitualmente conhecida por ETS (do inglês *environmental tobacco smoke*).

1.3.1. Carcinogenicidade do tabaco

Na composição do fumo do tabaco encontram-se numerosas substâncias, das quais cerca de 50 estão classificadas pela IARC como compostos de “evidente potencial carcinogénico” para os humanos e animais (7).

Outro aspeto importante reside no facto de a dimensão das partículas do “*sidestream smoke*” ser menor do que as do “*mainstream smoke*” e, por isso, quando se depositam no tecido pulmonar de um fumador passivo, alcançam mais rapidamente os espaços alveolares (45). Por este motivo, a exposição a este fumo do cigarro – ou o ato de “fumar em segunda mão” – constitui um importante fator de risco para cancro do pulmão e outras doenças do foro respiratório em não-fumadores (44, 46).

Behera (2014) conduziu um aprofundado estudo com o objetivo de quantificar um amplo painel de elementos vestigiais no fumo do cigarro (tanto o fumo “*mainstream*” como o “*sidestream*”). O autor concluiu que o “*sidestream smoke*” contém concentrações mais elevadas de elementos tóxicos, comparativamente ao “*mainstream smoke*”. No entanto, numa avaliação do risco, o “*sidestream smoke*” será menos ofensivo para a saúde humana, devido à diluição prévia das partículas quando são emitidas para o ambiente. Apesar disso, tem-lhe sido atribuída uma importância crescente, face ao crescente número de casos de cancro de pulmão reportados em fumadores passivos. Por seu lado, o “*mainstream smoke*” representa um risco maior para a saúde humana (40), atendendo ao facto de se tratar de uma quantidade maior de fumo que é diretamente inalada pelo fumador.

Quando saudáveis, os pulmões são estruturalmente detentores de mecanismos de defesa contra o efeito de potenciais agentes patogénicos provenientes do ar inalado. Um défice de causa nutricional ou imunológica pode originar alterações nas estruturas de defesa do pulmão, desencadeando um processo patológico (46, 47). Vários estudos sugerem que o fumo do cigarro diminui a atividade surfactante (tensioativa) do líquido bronco-alveolar, uma mistura complexa de fosfolípidos e proteínas, a primeira barreira de defesa contra partículas ou componentes gasosos nocivos presentes no fumo (48). Como complemento, os pulmões possuem ainda mecanismos de defesa bioquímicos assegurados nomeadamente pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx), SOD e GST, e pela glutathione na sua forma reduzida.

Estes mecanismos de defesa protegem o pulmão da toxicidade das ROS e outros metabolitos reativos gerados pelo órgão em resposta ao contato com compostos estranhos ao organismo (49). O fumo do cigarro desencadeia este mecanismo de defesa enzimático, um processo que o organismo humano desenvolveu na tentativa de minimizar os efeitos na saúde causados pelo fumo do cigarro, adiando o desenvolvimento de cancro do pulmão (10).

As doenças pulmonares resultantes do consumo de tabaco evoluem de forma desproporcional entre a população, principalmente entre idosos, devido ao longo período de lesão cumulativa e às modificações que ocorrem no organismo, inerentes à idade (50).

É na faixa etária acima dos 65 anos que se observa um aumento na incidência de cancro do pulmão, muito possivelmente pelo facto da idade média de iniciação do consumo de tabaco ser inferior a 20 anos, pelo que nessa altura se completa o intervalo de tempo necessário para que os efeitos cancerígenos do tabaco se manifestem (2). Mais tarde, na faixa etária dos 80 anos, ocorre o oposto, verificando-se um decréscimo na incidência dos casos. Isto poderá ser explicado pela reduzida prevalência de fumadores ativos nesta idade ou pelo facto de as pessoas que alcançam aquela idade poderem ser portadoras de uma resistência genética a determinados fatores de risco (2).

1.4. ELEMENTOS VESTIGIAIS

1.4.1. Definição / Classificação

Burguera & Burguera (51), na sua extensa revisão sobre técnicas associadas a detetores de espectrometria atómica para doseamento de elementos vestigiais, faz menção aos diferentes tipos de elementos presentes no organismo, classificados de acordo com a abundância em que se encontram. Assim, podem ser “macro”, “micro” ou “vestigiais”, representando respetivamente 93%, 5% e <1% da massa corporal total. A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define elementos vestigiais como “qualquer elemento presente em concentração inferior a 100 partes por milhão (ppm) ou 100 µg/g” (52). A determinação destes elementos em amostras complexas requer, como se compreende, métodos analíticos de elevada sensibilidade (por estarem em concentração muito baixa), especificidade, precisão e exatidão, bem como com capacidade para determinar um vasto leque de elementos em simultâneo (51).

Strachan (53) define elementos “essenciais” como elementos que devem estar presentes na dieta alimentar, necessários para o funcionamento normal do organismo. São, na sua maioria, elementos presentes (como cofatores) em enzimas envolvidas em numerosos e importantes processos bioquímicos do organismo, incluindo, nomeadamente, o controlo da expressão dos genes e a proteção contra espécies oxidantes. No seu todo, não representam mais do que 1% da massa corporal total de um indivíduo – daí “elementos vestigiais”. Os principais elementos vestigiais presentes no organismo humano encontram-se enunciados na tabela 4. Aí indica-se também os elementos que estão comprovadamente aceites como “essenciais” para os humanos.

O seu aporte e presença no organismo em concentrações adequadas é indispensável para a manutenção do estado de saúde. Desta forma, quando aquele equilíbrio não se verifica, estamos perante uma iminente desordem e desregulação no que respeita a numerosos processos e mecanismos fisiológicos que ocorrem no organismo.

Muitos outros elementos vestigiais são eminentemente tóxicos (e.g., Cd, Pb, As, Hg). A sua presença no organismo causa alterações de natureza toxicológica mesmo em muito baixas concentrações.

Tabela 4: Principais elementos vestigiais e sua essencialidade para os humanos. Adaptado de (53, 54)

Elemento	Essencialidade para o Homem	Elemento	Essencialidade para o Homem
Arsénio (As)	?	Lítio (Li)	?
Bromo (Br)	??	Manganês (Mn)	✓
Cádmio (Cd)	??	Molibdénio (Mo)	✓
Crómio (Cr)	✓	Níquel (Ni)	?
Cobalto (Co)	✓	Selénio (Se)	✓
Cobre (Cu)	✓	Silício (Si)	?
Flúor (F)	✓	Estanho (Sn)	??
Iodo (I)	✓	Vanádio (V)	?
Ferro (Fe)	✓	Zinco (Zn)	✓
Chumbo (Pb)	??	Berílio (Be)	?

1.4.2. Elementos vestigiais no pulmão

1.4.2.1. Considerações gerais

A planta do tabaco – *Nicotiana tabacum* – absorve e acumula elementos vestigiais, principalmente a partir do solo (40). Alguns destes elementos são muito tóxicos e prejudiciais à saúde humana, mesmo quando inalados ou ingeridos em pequenas quantidades (45). Na planta do tabaco, as concentrações dos elementos variam ao longo do caule/pedúnculo, sendo mais elevadas nas folhas mais velhas e mais baixas nas folhas mais jovens. Nos cigarros, as concentrações dos elementos diferem entre marcas e mesmo entre cigarros da mesma marca. No cigarro, para além do tabaco, elementos metálicos como o Al, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni e Zn estão também presentes no papel e no filtro, e podem igualmente passar para o fumo do cigarro (45, 55).

É conhecido o papel fulcral de alguns elementos vestigiais na génese, progressão e supressão tumoral, documentado em numerosas investigações epidemiológicas, estudos nutricionais, estudos bioquímicos e estudos clínicos. Contudo, existem muitos elementos vestigiais cujo papel no desenvolvimento do cancro do pulmão não está ainda bem definido (56-59). Numa revisão realizada por Fukuda *et al.* (2004), o autor realça a associação entre a carcinogénese pulmonar e os elementos Cr e Ni. Salaria também elevadas taxas de mortalidade por cancro do pulmão entre profissionais expostos ao berílio (54).

Tabela 5: Principais características, efeitos no organismo e concentração ($\mu\text{g/g}$) de diversos elementos vestigiais em cigarros reportadas em estudos anteriores.

Elemento	Características/ Efeitos no organismo	Concentração nos cigarros [$\mu\text{g/g}$] (Ref. ^a)
Alumínio	Apresenta-se em concentrações muito elevadas nos cigarros. Desempenha um importante papel no funcionamento normal do cérebro, estando por isso, associado à doença de Alzheimer (55).	[699-1200] (45, 55)
Manganês	É uma forte neurotoxina. Está relacionado com a Doença de Parkinson. Contudo, a correlação entre hábitos tabágicos e a doença é inversa (55).	[155-400] (45, 55)
Ferro	Importante constituinte da hemoglobina. Tanto a insuficiência como o excesso de Fe no organismo podem conduzir a dano oxidativo do ADN, via reação de Fenton (54)	[325-520] (45, 55)
Estrôncio	Embora presentes em concentrações consideráveis nos cigarros, são necessários mais estudos para determinar a sua relevância toxicológica.	[29,7-49,5] (45, 55)
Bário		[40,7-56,6] (45, 55)
Crómio	A sua relação com o cancro do pulmão está bem estabelecida tanto por exposição ocupacional como devido a hábitos tabágicos. Acumula-se nas vias respiratórias dos trabalhadores expostos ao metal, podendo induzir stress oxidativo (60). O Cr(VI) atravessa rapidamente a membrana celular contrariamente ao Cr(III) (74).	[<0,1-3,45] (45, 55)
Níquel	Encontra-se associado a vários tipos de cancro, principalmente do trato respiratório. A exposição ao elemento é sobretudo de natureza ocupacional (54). Caracteriza-se por ser altamente mutagénico (55), indutor de deleções e mutações no ADN, e causador de dano oxidativo.	[<2-400] (45, 55)
Cobre	A sua forma reduzida (Cu^+) serve de catalisador na reação de Fenton, potenciando a formação de radicais livres.	[7,73-13,0] (61)
Zinco	Desempenha uma função essencialmente protetora no organismo, uma vez que é um dos constituintes da enzima SOD, responsável pela eliminação do radical superóxido e está envolvido na ativação de enzimas reparadoras do ADN (54). Por outro lado, quando em baixas concentrações pode constituir um fator pró-carcinogénico pois é necessário para um adequado funcionamento do sistema imunitário (55).	[16,8-30,5] (45, 55)
Arsénio	De grande importância no que respeita a exposição ocupacional e ambiental. O As e os seus compostos, por meio de inalação continuada, induz importantes danos agudos e crónicos no organismo (62).	<1 (45, 55)
Selénio	Um elemento essencial com importante função protetora, uma vez que integra proteínas responsáveis por combater o stress oxidativo – as selenoproteínas, (58, 59).	[<0,007-0,091] (45, 55)
Cádmio	Poluente ocupacional e ambiental altamente tóxico (e sem qualquer função/efeito benéfico para o organismo). Entre outros efeitos, é indutor de stress oxidativo e apoptose, com capacidade de alterar estrutural e funcionalmente a membrana celular, provocar danos estruturais no ADN, alterar a expressão genética e inibir a produção mitocondrial de ATP (63).	[0,5-3,5] (64)
Chumbo	Amplamente encontrado no meio ambiente (solo, plantas e água). Muito tóxico, tem a capacidade de se ligar às proteínas e interferir com enzimas e proteínas estruturais conduzindo ao dano oxidativo dos tecidos (65, 66).	[0,6-2,00] (67)

Com base nestas características, a IARC classificou os diferentes elementos em três diferentes categorias, indicadas na tabela 6.

Tabela 6: Classificação dos elementos vestigiais de acordo com a IARC (68).

Categoria	Grupo	Elementos
Carcinogénicos para os humanos	1	Arsénio e seus compostos; Cádmio e seus compostos Crómio hexavalente Níquel e seus compostos
Provavelmente carcinogénicos para os humanos	2A	Compostos inorgânicos do chumbo
Possivelmente carcinogénicos para os humanos	2B	Restantes metais

1.4.2.2. Revisão bibliográfica de estudos anteriores

Revedo estudos anteriores com objetivos e metodologias idênticos aos dos presente trabalho, são vários os elementos vestigiais que foram já objeto de determinação no tecido pulmonar. Catalani *et al.* (60) fizeram uma meta-análise de 58 artigos, separando os resultados em tecido canceroso, tecido não afetado de indivíduos diagnosticados com cancro e controlos (tecido normal, de indivíduos sem cancro). Os autores referem níveis semelhantes de elementos como Cr, Ni, Pb, Co, Cu e Zn no tecido normal (controlos) e no tecido não afetado (dos doentes), e níveis mais baixos no tecido canceroso. Foi ainda observada uma considerável variação interindividual na concentração no tecido pulmonar dos elementos estudados (60).

Bocio *et al.* (69) analisaram um conjunto de 22 amostras, colhidas de indivíduos residentes na proximidade de uma incineradora de lixo potencialmente contaminado. Como critério de inclusão, os indivíduos teriam de ter vivido durante pelo menos durante 10 anos naquela área. Para além de tecido pulmonar, foram também analisadas amostras de cérebro, tecido ósseo, rim e fígado. Foram determinados os elementos As, Be, Cd, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tl e V. A maioria destes elementos encontrava-se em níveis não detetáveis (As, Be, Tl e V) ou muito próximos dos limites de deteção (Cr, Hg e Mn) em todos os tecidos. Foi observada uma diferença significativa entre géneros (masculino e feminino) nas concentrações de Cd de Sn, embora este presente em concentrações bastante mais baixas (69).

Com o objetivo de relacionar a exposição ocupacional/ambiental a alguns elementos metálicos com o aparecimento de doenças pulmonares, incluindo cancro do pulmão, De

Palma *et al.* (70) estudaram um conjunto de 45 pacientes em fase inicial de cancro do pulmão de células não-pequenas e 8 controlos. Foram colhidas 2 amostras de cada paciente: tecido canceroso e tecido “visivelmente saudável”. Os pacientes foram categorizados de acordo com os hábitos tabágicos, histopatologia e localização do tumor. Foram determinados os elementos As, Be, Cd, Co, Cr, Ni e Pb. Os autores relatam níveis superiores de Cd, Ni e Pb tanto no tecido visivelmente não afetado como no canceroso, face aos controlos. O Cd é particularmente influenciado pelos hábitos tabágicos, atingindo níveis elevados no tecido pulmonar dos fumadores. O Ni encontrou-se distribuído nos pulmões de forma não homogénea e o Pb acumulou-se no tecido pulmonar visivelmente não afetado. Por outro lado, não se verificou nenhuma relação entre os níveis de Cr e Co e hábitos tabágicos. O As e o Be estavam presentes em concentrações baixas, podendo indicar que, não havendo uma exposição contínua, a acumulação destes elementos é muito pouco provável (70).

Hayes (71) realizou uma vasta revisão sobre a carcinogenicidade de alguns elementos vestigiais (As, Cr, Ni). Em termos gerais, verificou um maior número de casos de cancro do pulmão entre trabalhadores envolvidos diretamente na produção de pesticidas à base de As e em indivíduos residentes na proximidade de zonas industriais que operavam com As. O autor destaca o sinergismo existente entre o consumo de tabaco e a exposição (ocupacional ou ambiental) ao As, o qual potencia o risco. Em relação ao Ni, destaca que a exposição aos compostos solúveis deste elemento metálico potencia o desenvolvimento de cancro do pulmão e das vias respiratórias (71).

Zhang *et al.* (65) determinaram a concentração de 15 elementos vestigiais em 60 amostras de tecido pulmonar (30 de tecido saudável e 30 de tecido canceroso) de pacientes diagnosticados com cancro do pulmão residentes em duas cidades chinesas onde se verifica uma elevada incidência da doença. Estudos anteriores colocaram de lado a hipótese de fatores como tabaco ou exposição ocupacional estarem na origem deste facto. A origem do problema estaria sim na inalação de fumos resultantes da queima de carvão para fins domésticos (cozinhar e aquecimento das casas, por sua vez desprovidas de qualquer mecanismo de ventilação). Os resultados revelaram diferenças significativas nas concentrações de V, Fe, Zn, Cd, Ni, Cu, Se e Pb entre o tecido saudável e não-saudável, sendo que o V, Fe, Zn e Cd se apresentavam em concentrações inferiores no tecido canceroso e o Ni, Cu, Se e Pb em concentrações superiores, comparativamente com o tecido saudável. Os autores classificaram o Cu e o Pb como fatores de risco e o Zn como fator de proteção (65).

Cobanoglu *et al.* (72) estudaram a relação entre a concentração de alguns elementos vestigiais no soro e o cancro do pulmão. Para o efeito efetuaram a determinação da concentração sérica de Cu, Pb, Zn, Fe, Co, Cd, Mn e Mg em pacientes já diagnosticados

(n=30) e em indivíduos saudáveis (controles; n=20). À semelhança do descrito por Zhang *et al.* (65), o Zn é apresentado como fator de proteção. Atendendo às baixas concentrações de Zn verificadas nos pacientes diagnosticados com cancro do pulmão, os autores deixam a sugestão de que baixos níveis séricos de Zn podem induzir o aparecimento da doença (72).

1.4.3. Doseamento de elementos vestigiais

A espectrometria de massa acoplada a plasma induzido (ICP-MS, do inglês (do inglês *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) é atualmente a técnica de eleição para a determinação de elementos vestigiais (metais, metaloides e mesmo vários elementos não metálicos). Caracteriza-se por uma elevada sensibilidade (baixos limites de deteção, tipicamente na ordem de ppt ou partes por trilião), capacidade de rápida análise multi-elementar e capacidade de análise isotópica⁴ (73). Utiliza uma fonte de elevada temperatura (plasma), adequada para os processos de atomização e ionização das espécies químicas da amostra. O plasma é formado numa tocha de quartzo, por onde passa o gás plasmogénico (árgon). O fluxo interno, denominado de nebulizador, é o responsável pelo transporte da amostra (nebulizada) para o plasma.

A amostra, devidamente solubilizada, quando é aspirada para o equipamento, passa à forma de aerossol no nebulizador. Posteriormente, o fluxo de gás do nebulizador encarrega-se do transporte do aerossol até ao plasma, onde ocorre a vaporização, atomização, excitação e ionização das espécies. O plasma produz, de forma muito eficiente, iões monovalentes positivos, posteriormente transportados para o espectrómetro de massa (74).

É necessária uma especial atenção à ocorrência de interferências, devido a massas semelhantes entre as espécies que se formam no plasma e as espécies ionizadas dos analitos, uma situação que pode ser corrigida atempadamente (73).

⁴ **Isótopos:** O dispositivo de separação de massa do ICP-MS separa os iões com base na sua razão massa-carga. Esta característica permite a identificação e distinção de diferentes isótopos de um mesmo elemento. A seleção dos isótopos de cada elemento é feita de acordo com o isótopo que apresentar menos interferências e maior abundância relativa.

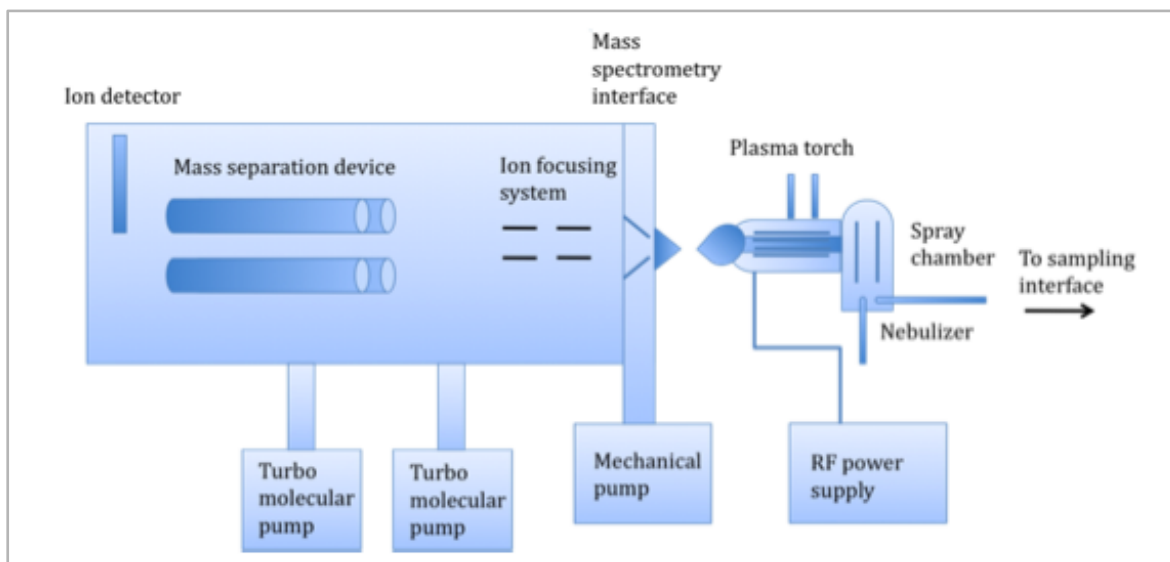


Figura 4: Representação dos principais componentes de um equipamento de ICP-MS. Sucintamente, a amostra é aspirada para o nebulizador e convertida em aerossol. Para corrigir possíveis efeitos de matriz e minimizar interferências (alterações de sensibilidade) decorrentes de uma matriz complexa, recorre-se à adição à amostra de padrões internos. Do aerossol, apenas as gotas de menores dimensões seguem para o plasma, onde ocorre a ionização (produção de espécies elementares carregadas positivamente). O dispositivo de separação de massa efetua a separação dos íões com base na sua razão massa-carga. Na fase final, o detetor de íões converte os íões em sinal elétrico, que é amplificado e analisado pelo software. Retirado de (73).

2. OBJETIVOS

2. OBJECTIVOS

Com base no atrás exposto, o presente trabalho teve como objetivo genérico contribuir para a definição da importância dos elementos vestigiais no desenvolvimento do cancro do pulmão.

O trabalho foi realizado com base nos seguintes pressupostos:

- (i) está bem estabelecido que o fumo do tabaco é um importante (o mais importante) fator de risco para o cancro do pulmão;
- (ii) são também bem conhecidas as propriedades tóxicas de muitos elementos vestigiais, e em particular o potencial carcinogénico de muitos deles.

Neste contexto,

- (1) se se demonstrar que o tabaco contém quantidades apreciáveis desses elementos;
- (2) se se demonstrar que esses elementos passam em quantidade significativa para o fumo do cigarro, tornando-se assim suscetíveis de serem inalados e chegarem ao pulmão;
- (3) se se demonstrar que o tecido pulmonar mostra “marcas” da exposição a esses elementos vestigiais,

então é possível concluir que os elementos vestigiais em causa terão um papel importante (paralelamente a outras substâncias reconhecidamente cancerígenas também presentes no fumo do tabaco, evidentemente) um papel importante no desenvolvimento do cancro do pulmão.

Para conseguir estes objetivos,

- (1) determinou-se o teor de um grande número de elementos vestigiais em amostras de cigarros (tabaco), de várias marcas – as marcas mais consumidas em Portugal – com a finalidade de ficar saber qual o teor típico/médio de cada metal analisado nos cigarros, e se existem diferenças muito significativas entre as várias marcas;
- (2) determinou-se o teor desses mesmos elementos nas cinzas restantes da normal queima dos cigarros (como quando são fumados), com o intuito de saber se os elementos presentes no tabaco (cigarro) passam efetivamente para o fumo e em que percentagem isso se verifica;
- (3) determinou-se o teor desses mesmo elementos vestigiais no tecido pulmonar, de fumadores e não-fumadores, para perceber se a exposição ao fumo do tabaco provoca efetivamente diferenças nos níveis de elementos no tecido pulmonar.

Para realizar este estudo, foram recolhidas amostras (fragmentos de $\pm 1 \text{ cm}^3$) do pulmão

Mariana Cruz – Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense 20

direito, lobo superior, durante exames de autópsia realizados no INMLCF, Delegação do Norte. As amostras foram depois solubilizadas (por digestão ácida em vaso fechado, em forno de micro-ondas) e as soluções obtidas foram analisadas para um vasto painel de elementos vestigiais por ICP-MS.

Utilizando o mesmo procedimento analítico, foram também analisadas 24 diferentes marcas de cigarros, obtidas em três tabacarias diferentes, marcas essas indicadas pelos comerciantes como sendo as mais vendidas. A análise incidiu tanto sobre os cigarros, tal como são adquiridos, como sobre as cinzas resultantes da sua queima nas mesmas condições em que são fumados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Água Ultrapura – produzida num sistema de purificação de água comercial, marca Arium® pro B (Sartorius, Alemanha).

Reagentes

- Ácido nítrico 65% (m/v) de qualidade p.a. (Chem-Lab NV, Bélgica), para descontaminação do material (usado como solução aquosa a 10% v/v);
- Ácido nítrico $\geq 69\%$ (m/v) e peróxido de hidrogénio $\geq 30\%$ (v/v) de elevada pureza (TraceSELECT®) ambos da Fluka (França e Alemanha, respetivamente), usados na solubilização das amostras.

Soluções para a análise por ICP-MS

- Solução padrão multielementar: ICP-MS 200.8-CAL1-1 (Isostandards Material, Madrid, Espanha);
- Solução padrão multielementar: Plasma CAL Q.C. N.º. 3 (SCP Science, Baie D'Urfé, QC, Canadá);
- Solução padrão (Ba, Ag): AccuTrace™ Reference Standard, ICP-MS 200.8-CAL2-1 (AccuStandard, New Haven, CT, USA);
- Solução de padrões internos (Sc, Y, In, Th e Bi): AccuTrace™ Reference Standard, ICP-MS 200.8-IS-1 (AccuStandard, New Haven, CT, USA);
- Solução de “tuning” (contendo Be, Mg, Co, In, Pb): AccuTrace™ Reference Standard, ICP-MS 200.8-TUN-1 (AccuStandard).

Nota: Todas as diluições destas soluções comerciais foram feitas com água ultrapura e HNO₃ concentrado ($\geq 69\%$ m/v) de elevada pureza (TraceSELECT®), ficando este numa concentração final de 2% (v/v).

Equipamentos

- Estufa (Raypa, Spain), para secagem das amostras até peso constante;
- Balança Kern ABT 120-5 DM para pesagem das amostras;
- Forno de micro-ondas (Milestone MLS-1200 mega, Itália), com um rotor HPR 1000/10 S, para digestão das amostras;
- Balança para determinação do teor de humidade nos cigarros (HR73 Moisture Analyzer, da Mettler Toledo);
- Aparelho de ICP-MS, modelo PlasmaQuad 3, da marca VG Elemental (Winsford, Reino Unido).

Materiais de referência certificados – para o controlo de qualidade analítica: BCR 679 (repolho branco), do European Commission Joint Research Centre; DOLT-4 (fígado de peixe) e DORM-3 (proteína de peixe), ambos do National Research Council, Canadá. Os materiais de referência certificados foram solubilizados e analisados nas mesmas condições que amostras.

3.2. COLHEITA DE AMOSTRAS

3.2.1. Tecido pulmonar

As amostras de tecido pulmonar foram colhidas no decurso de autópsias médico-legais realizadas na Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), no período de outubro 2013 a abril 2014. O grupo de estudo foi constituído por indivíduos do sexo masculino e feminino, fumadores e não-fumadores, com uma idade média de $57,7 \pm 19,6$ anos, como indicado na tabela 7. De alguns indivíduos ($n=19$) não foi possível obter toda a informação pretendida, nomeadamente os hábitos tabágicos. O mesmo se verificou em todos os casos no que se refere à ocupação profissional, porque tal informação não constava no processo dos indivíduos.

Tabela 7: Caracterização da amostra do estudo.

	Total	Homem	Mulher	Não-Fumador	Fumador	Hábitos tabágicos desconhecidos
N	79	48	31	36	24	19
IDADE:						
Média	57,7	55,5	64,5	62	53	--
dp	19,6	16,5	22,9	23,8	14,7	--

As amostras foram sempre colhidas até no máximo 72 horas após a morte. Para evitar possíveis contaminações, todo o material usado no procedimento de colheita e no acondicionamento e manuseamento das amostras foi previamente descontaminado com solução de HNO_3 10% (v/v) seguido de abundante lavagem com água ultrapura. Cumprindo um protocolo escrito elaborado para o efeito (anexo II), as amostras (pequeno fragmento de tecido pulmonar com cerca de $0,5\text{-}1\text{ cm}^3$) foram sempre colhidas do lobo superior direito do pulmão (Figura 5).

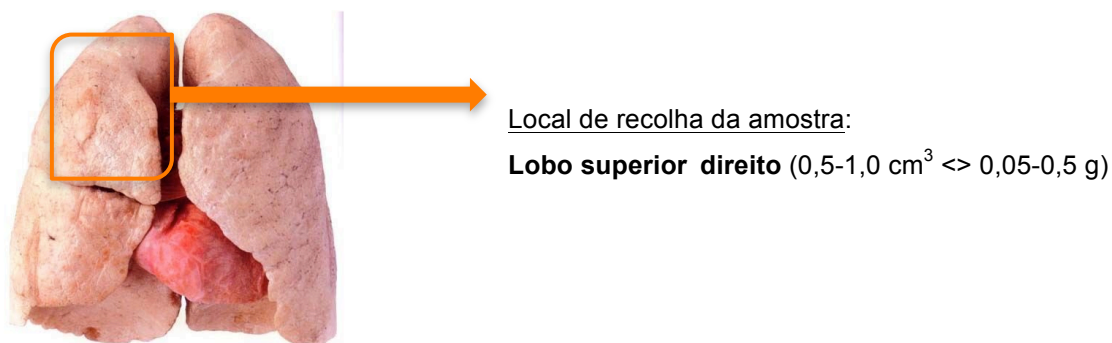


Figura 5: Pulmão – indicação do local de recolha da amostra de tecido pulmonar.

Após a recolha, as amostras foram de imediato lavadas com água ultrapura, para eliminar todos os vestígios de sangue e/ou de outros fluídos. De seguida, foram colocadas em tubos de plástico (polipropileno), previamente descontaminados e devidamente identificados, e armazenadas em arca congeladora (-4°C) até à sua análise.

3.2.2. Cigarros

Em três tabacarias da cidade do Porto procedeu-se à aquisição de maços de cigarros de 24 marcas diferentes, identificadas pelos vendedores como sendo as marcas mais comercializadas atualmente. Para efeitos deste estudo, foi-lhes atribuído um código de identificação, como se identifica abaixo:

Tabela 8: Marcas de cigarros analisadas.

1. MB	2. MBG	3. LM	4. LML	5. CH	6. CHL	7. LS	8. CM	9. CMA	10. CMB	11. CHE	12. PT
13. CG	14. SGG	15. SGV	16. SGF	17. SGA	18. JPSR	19. JPSO	20. AB	21. WT	22. 2PM	23. DN	24. PHM

3.3. PRÉ-TRATAMENTO E SOLUBILIZAÇÃO DE AMOSTRAS

3.3.1. Tecido pulmonar

Após descongelação, as amostras foram colocadas em estufa de secagem a uma temperatura de aproximadamente 110°C até peso constante (cerca de 24-48 horas). Seguidamente foram pesadas (massas entre cerca de 0,03 e 0,5 g) diretamente nos vasos de digestão do forno micro-ondas, previamente descontaminados por lavagem com solução HNO_3 10% (v/v) e água ultrapura.

Para a digestão ácida, foram adicionados aos vasos 2,0 mL de ácido nítrico $\geq 69\%$ (m/v) e 0,5 mL de peróxido de hidrogénio $\geq 30\%$ (v/v). Seguidamente os vasos foram hermeticamente fechados e colocados no forno de micro-ondas. O programa do forno de

micro-ondas utilizado foi o sugerido pelo fabricante para este tipo de amostras e encontra-se indicado na Tabela 9. O procedimento de digestão mostrou-se adequado, conduzindo à solubilização completa das amostras.

Tabela 9: Condições de operação do forno de micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Observação
1	250	1	Iniciar a oxidação suave da matéria orgânica
2	0	2	Interrupção do fornecimento de energia para evitar a ocorrência de reações exotérmicas rápidas, com perigo de explosão
3	250	5	Completar gradualmente o processo de oxidação da matéria orgânica e completa solubilização da amostra
4	400	5	“
5	600	5	“

3.3.2. Cigarros

De cada marca (cada maço) foram analisados individualmente dois cigarros, depois de retirado o filtro, pesados e digeridos em dois vasos diferentes. A digestão foi feita nas mesmas condições que as amostras de tecido pulmonar.

Para efeitos da expressão do resultados em massa seca, foi feita a determinação da humidade (teor de H₂O) dos cigarros. Esta determinação foi feita com recurso a uma balança própria para o efeito (HR73 *Moisture Analyzer*, da Mettler Toledo) sobre dois cigarros da mesma marca (mesmo maço) em simultâneo.

3.3.3. Cinzas do cigarro

Para obtenção das cinzas, os cigarros forma queimados naturalmente, como quando são fumados. Devido a haver uma grande diminuição de massa, juntou-se a cinza de dois cigarros da mesma marca (mesmo maço) para constituir a amostra, isto é, em cada vaso de digestão colocou-se a cinza resultante da queima de dois cigarros da mesma marca. Depois procedeu-se à solubilização das cinzas também nas mesmas condições das amostras de tecido pulmonar e de cigarro.

Em todos os casos, após o processo de digestão ácida no forno de micro-ondas o conteúdo dos vasos foi transferido quantitativamente para balões volumétricos e diluído até 50 mL com água ultrapura. As soluções foram depois transferidas para tubos de plástico, hermeticamente fechados, e conservadas no frigorífico até à sua análise.

3.4. ANÁLISE POR ICP-MS

Em tubos de plástico devidamente descontaminados, colocaram-se 4 mL das soluções anteriores (amostras), 5 mL de água ultrapura e 1 mL de solução de Padrão Interno⁵.

Todos os elementos foram analisados simultaneamente, exceto Al, Mn, Fe, Sr e Ba. Em virtude de se encontrarem em concentrações muito mais elevadas, para a determinação destes elementos as soluções foram submetidas a uma diluição adicional antes da sua análise nas condições acima indicadas.

Importa referir que o equipamento era sempre sujeito a um processo de “tunning”⁶ antes de cada série analítica, pelo que as condições indicadas na parte inferior da tabela são valores “típicos”, podendo ter sido algo diferentes de série para série.

Tabela 10: Condições de operação do ICP-MS.

PARÂMETRO INSTRUMENTAL	CONDIÇÃO
<i>Instrument detector</i>	<i>Sequential</i>
<i>Aquisition mode</i>	<i>Continuous</i>
<i>Pre-scan selected</i>	<i>Yes</i>
SURVEY RUN SETUP	
<i>Sweeps</i>	20
<i>Dwell time</i>	300
<i>Channels per mass</i>	10
<i>Acquisition duration</i>	15
MAIN RUN SETUP	
<i>Main run</i>	<i>Peak jumping</i>
<i>Sweeps</i>	100
<i>Dwell time</i>	10.000
<i>Channels per mass</i>	1
<i>Channels spacing</i>	0,02
<i>Forward power (W)</i>	1520
<i>Nebuliser (L/min)</i>	0,90
<i>Auxiliary (L/min)</i>	0,90
<i>Cool (L/min)</i>	13,0
<i>Replicates</i>	2

⁵ **Padrões Internos:** Elementos adicionados às soluções em análise numa concentração constante (no caso foram usados os isótopos ¹⁵⁹Tb, ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹¹⁵In e ²⁰⁹Bi). Servem como referência interna para corrigir efeitos de matriz bem como alterações na sensibilidade do equipamento no decurso das séries analíticas.

⁶ **“Tunning”:** Processo de ajuste das condições instrumentais com vista à maximização da sensibilidade e estabilidade do sinal analítico e à minimização de interferências. Feito após a ligação e estabilização do equipamento, ao iniciar cada série analítica (i.e., antes de se iniciar a leitura das soluções de calibração).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ELEMENTOS VESTIGIAIS NOS CIGARROS

Como referido anteriormente, foram analisadas 24 diferentes marcas de cigarros, adquiridas em três tabacarias da cidade do Porto. As marcas foram indicadas pelos comerciantes como sendo as “mais vendidas” no respetivo estabelecimento.

A Tabela 11 resume os resultados obtidos (concentração média de cada elemento analisado, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo), expressos em $\mu\text{g/g}$ (peso seco).

Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) obtidos na análise dos **cigarros**.

	Elemento											
	Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
n	18	18	18	18	24	24	24	24	24	24	24	24
>LD (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
média	438,3	281,6	118,0	79,2	20,0	16,8	11,6	29,3	0,56	1,86	0,91	0,63
DP	91,3	223,6	24,7	11,6	72,8	58,3	4,63	13,8	0,31	0,97	0,28	0,21
mediana	445,2	216,4	112,8	80,2	1,74	1,16	10,7	26,2	0,49	1,68	0,82	0,56
mínimo	216,3	133,0	93,2	55,0	1,04	0,76	6,94	18,9	0,28	0,67	0,60	0,49
máximo	582,0	970,0	205,4	102,4	350,9	271,1	29,8	87,8	1,73	3,88	1,54	1,53

Em termos de valores medianos, a ordem de abundância dos elementos analisados foi a seguinte: Fe (cerca de 4 mg/g), seguido do Al, Mn e Sr (acima de 100 $\mu\text{g/g}$), Ba, Zn e Cu (acima de 10 $\mu\text{g/g}$). Depois seguiu-se o Cr, o Se e o Ni (com teores medianos entre 1 e 2 $\mu\text{g/g}$), sendo que, porém, o Cr e o Ni se encontraram muitos elevados em algumas amostras (na ordem de algumas centenas de $\mu\text{g/g}$). Os teores dos elementos mais tóxicos (Pb, Cd, As), foram sempre inferiores a 2 $\mu\text{g/g}$, com valores médios e medianos abaixo de 1 $\mu\text{g/g}$.

A figura seguinte resume graficamente os resultados obtidos e mostra que podem existir diferenças importantes no teor de elementos vestigiais de marca para marca.

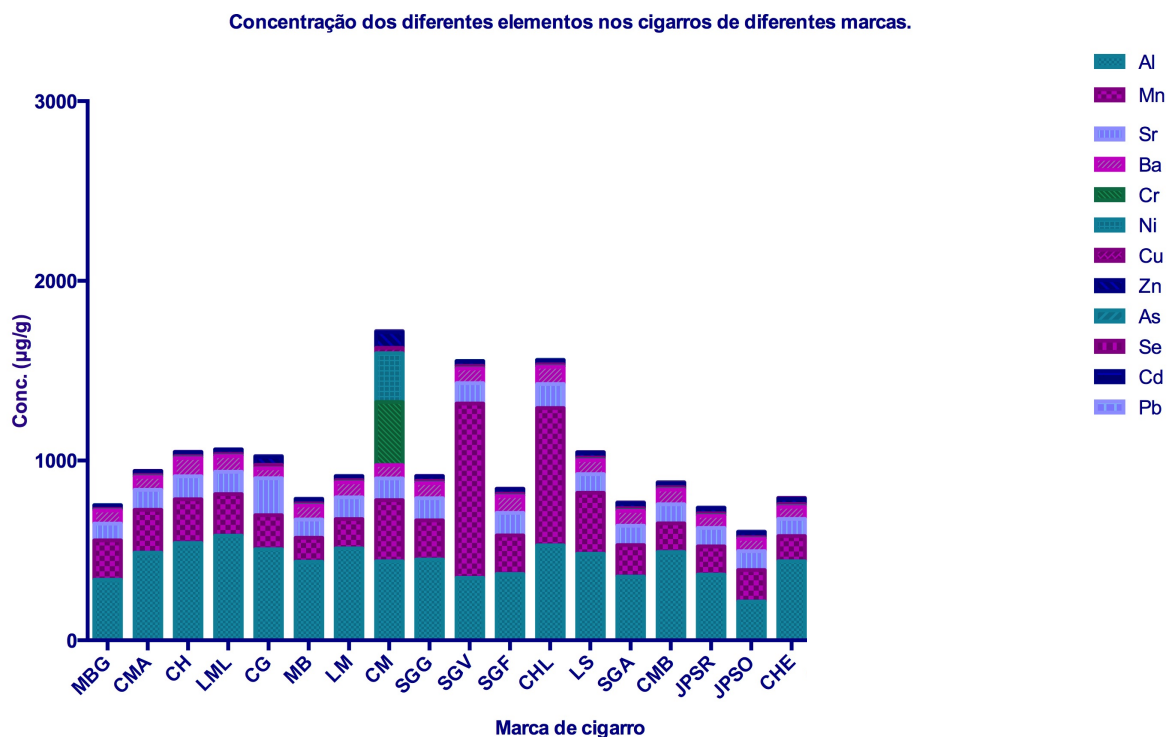


Figura 6: Representação gráfica comparativa do teor ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos diferentes elementos vestigiais nos cigarros das várias marcas analisadas.

Em duas revisões sobre este assunto (elementos vestigiais no tabaco), por Chiba & Masironi (52) e mais recentemente por Bernhard *et al.* (58), o Al é referido como o elemento presente em maiores concentrações, com teores variando entre 699-1200 $\mu\text{g/g}$, valores algo superiores aos por nós obtidos ($438,3 \pm 91,3 \mu\text{g/g}$).

Tem sido amplamente invocada uma pretensa associação do Al à doença de Alzheimer, embora não seja claro o concreto mecanismo de ação. Para além dos importantes efeitos tóxicos no sistema nervoso central, o Al também causa problemas ósseos e é potenciador de processos inflamatórios e oxidativos (58).

A concentração média de Mn nos cigarros foi de $281,6 \pm 223,6 \mu\text{g/g}$, um valor dentro do intervalo (155-400 $\mu\text{g/g}$) apresentado por Chiba & Masironi (52) e por Bernhard *et al.* (58). No entanto, é de notar a grande variação que os teores de Mn apresentaram entre as diferentes marcas de cigarros (de 133 a 970 $\mu\text{g/g}$). Embora seja um elemento essencial, o Mn é também uma forte neurotoxina. Em estudo tem estado, em particular, a sua ligação com a doença de Parkinson, em associação com o Cu (80).

O Sr e o Ba apresentaram-se também em concentrações elevadas, de $118,0 \pm 24,7 \mu\text{g/g}$ e $79,2 \pm 11,6 \mu\text{g/g}$, respetivamente, em ambos os casos valores significativamente superiores aos indicados por Chiba & Masironi (52): 29,7-49,5 $\mu\text{g/g}$ para o Sr e 40,7-56,6 $\mu\text{g/g}$ para o Ba.

No meio ambiente o Cr existe essencialmente sob a forma de Cr (III) (trivalente) ou Cr (VI) (hexavalente), sendo que o primeiro é elemento essencial, um nutriente que deve obrigatoriamente constar na dieta alimentar, não apresentando nenhum risco importante para a saúde humana (70). Quando na forma hexavalente, o Cr é classificado pela IARC como carcinogénico do grupo I, isto é, trata-se de um agente carcinogénico para os humanos. Na literatura (52) estão reportados valores de Cr no intervalo de $<0,1$ a $3,45 \mu\text{g/g}$. No nosso estudo foram obtidos valores medianos da mesma ordem de grandeza ($1,74 \mu\text{g/g}$). No entanto, duas amostras apresentaram valores muito elevados ($90,7$ e $350,9 \mu\text{g/g}$), de que resultou então um valor médio para a concentração (e para o desvio padrão dos resultados) também muito elevado ($20,0 \pm 72,8 \mu\text{g/g}$). É importante destacar que uma das vias mais comuns de exposição ao Cr é através da inalação, por exemplo em trabalhadores ligados à indústria metalúrgica, e nesses indivíduos tem sido reportado um acrescido número de casos de cancro do pulmão (70).

Os humanos encontram-se expostos ao Ni sobretudo através da inalação, consumo de água e alimentos, consumo de tabaco e contato com a pele, quando os solos ou água se encontram contaminados. Isto acontece devido ao facto de o Ni ser facilmente adsorvido pela matéria orgânica. O Ni poderá ser essencial em baixas quantidades mas é considerado um potencial agente carcinogénico (52, 70). A literatura indica teores de Ni no tabaco num intervalo muito amplo (<2 a $400 \mu\text{g/g}$) (52). A mediana das concentrações obtidas no nosso estudo foi de $1,16 \mu\text{g/g}$. No entanto, também neste caso, tal como com o Cr, observou-se uma concentração muito elevada em duas amostras, o que fez aumentar muito a média (e o desvio padrão) obtidos ($16,8 \pm 58,3 \mu\text{g/g}$).

O Cu é um elemento essencial, naturalmente presente nos tecidos vegetais. Para as folhas da planta do tabaco está descrito um teor médio de $15,6 \mu\text{g/g}$ (52). O valor médio por nós obtido nas amostras de cigarros analisadas ($11,6 \pm 4,63 \mu\text{g/g}$) mostrou-se bastante sobreponível, com pequena variação de amostra para amostra.

O Zn, pelo contrário, mostrou uma maior variação entre as várias marcas de tabaco estudadas, mas o valor médio ($29,3 \pm 13,8 \mu\text{g/g}$) situou-se dentro do descrito na literatura ($16,8$ - $30,5 \mu\text{g/g}$) (52). De acordo com Chiba & Masironi (52) o hábito tabágico não tem uma influência significativa no nível de Zn na maioria dos tecidos e fluídos humanos.

Os teores de Se nas plantas estão fortemente dependentes dos teores do elemento no solo. Chiba & Masironi (52) descrevem teores nos cigarros entre $0,007$ e $0,091 \mu\text{g/g}$. No nosso estudo obtiveram-se teores bastante superiores ($1,86 \pm 0,97 \mu\text{g/g}$).

O As mostrou-se presente em baixas concentrações nas amostras de cigarro: $0,56 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$, perfeitamente dentro do descrito na literatura (45, 55). Uma das principais fontes de exposição ao As é a água de consumo, contudo, em alguns locais, pode haver uma

exposição significativa através do ar atmosférico, contaminado pela queima de combustíveis fósseis, como o petróleo (70). Tem sido descrita uma incidência aumentada de cancro do pulmão em trabalhadores expostos a compostos de As inorgânico em minas e indústrias de fundição de cobre (82).

No que respeita ao Cd e ao Pb, encontramos teores médios de $0,91 \pm 0,28$ µg/g (Cd) e $0,63 \pm 0,21$ µg/g (Pb), variando entre 0,6 e 1,54 µg/g (no caso do Cd) e entre 0,49 e 1,53 µg/g (no caso do Pb). Em ambos os casos, os resultados obtidos encontram-se dentro dos intervalos determinados em estudos anteriores, mencionados na revisão feita por Chiba & Masironi (52).

4.2. ELEMENTOS VESTIGIAIS NAS CINZAS DO CIGARRO

Depois de avaliado o teor dos elementos vestigiais em estudo nas amostras de cigarro, esta segunda vertente do trabalho visou verificar se, e em que extensão, aqueles mesmos elementos eram volatilizados (passavam para o fumo) aquando da queima do cigarro. Para o efeito, como já foi referido anteriormente, procedeu-se à queima de dois cigarros do mesmo maço (mesma marca) e as cinzas foram misturadas, procedendo-se então à sua extração ácida no forno de micro-ondas. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 12 e graficamente representados na Figura 7.

Tabela 12: Estatística descritiva dos resultados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) obtidos na análise da cinza dos cigarros.

	Elemento											
	Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
n	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
>LD (%)	100	100	100	100	37,5	29,2	100	100	100	100	100	100
média	5197	1784	1283	997	81,6	43,72	65,13	182,7	2,54	7,57	1,87	4,04
DP	1721	567	384	331	134,9	82,97	25,91	76,0	1,26	6,39	0,89	1,64
mediana	5522	1672	1254	973	7,28	9,19	60,53	165,0	2,31	5,46	1,59	3,85
mínimo	2615	1050	716	459	2,46	4,64	31,64	85,76	1,07	1,67	0,72	2,21
máximo	10110	3285	2175	1775	476,2	379,1	157,8	466,5	6,65	28,0	4,16	10,5

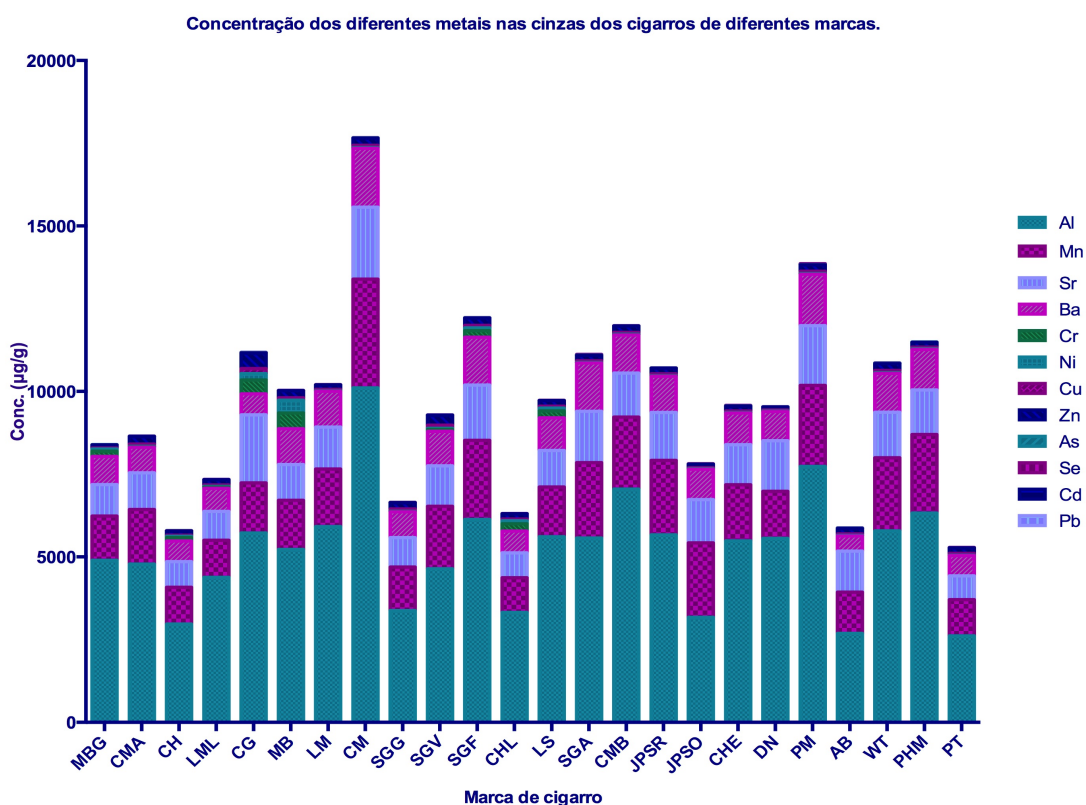


Figura 7: Representação gráfica comparativa da concentração ($\mu\text{g/g}$ peso seco) dos elementos vestigiais nas cinzas dos cigarros das diferentes marcas.

Usando os valores da massa de cinza obtida na queima dos cigarros (em média cerca de 0,0715 g) e a massa média dos cigarros (corrigida da humidade), avaliada em 0,498 g, foi possível calcular que, em média, se produzia uma massa de cinza que representava cerca de 14% da massa original do cigarro. Conhecida a concentração de cada elemento no cigarro calculou-se qual seria então a concentração nas cinzas no caso de não haver qualquer perda por volatilização durante a queima dos cigarros. Os valores assim obtidos foram comparados com os teores na cinza efetivamente encontrados (Tabela 14), sendo que a diferença se considerou representar a quantidade de elemento volatilizada.

Expressas em percentagem da massa média do elemento no cigarros, essas quantidades de elemento volatilizado – isto é, que passou para a fase gasosa (fumo do cigarro) tornando-se assim suscetível de ser inalado (seja pelo fumador ativo seja por fumadores passivos) – encontram-se indicadas na tabela seguinte.

Tabela 13: Percentagem da quantidade de elemento presente no cigarro que se volatiliza durante a sua combustão.

Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
--	10,1%	--	--	42,0%	63,1%	20,4%	11,5%	36,1	42,2%	70,8%	8,64%

Estes resultados permitiram concluir que, com exceção do Al, Sr e Ba (em que a volatilização pareceu ser não apreciável), em todos os restantes casos ocorre a passagem de uma quantidade muito significativa do elemento do cigarro para o fumo, que pode chegar a cerca de 70% no caso de Cd. Nestas circunstâncias, o ato de fumar um cigarro (em média contendo cerca de 0,5 µg de Cd, de acordo com os nossos resultados), representaria a potencial exposição do fumador (no pior cenário, isto é admitindo a inalação de todo o fumo do cigarro) a cerca de 0,35 µg de Cd. No extremo posto, caso do Pb, essa quantidade será muito menor, cerca de 0,027 µg.

4.3. ELEMENTOS VESTIGIAIS NO TECIDO PULMONAR

O resumo dos resultados obtidos na análise das amostra de tecido pulmonar encontra-se na Tabela 14. De acordo com os valores médios obtidos, a ordem de abundância foi a seguinte: Al (151,3 µg/g), Zn (61,7 µg/g), Cu (5,14 µg/g), Se (2,73 µg/g), Cr (1,99 µg/g), Ni (1,75 µg/g), Ba (1,06 µg/g), Sr (1,04 µg/g), Cd (0,68 µg/g), Mn (0,64 µg/g), As (0,54 µg/g) e Pb (0,38 µg/g).

Tabela 14: Estatística descritiva dos resultados (µg/g peso seco) obtidos na análise do **tecido pulmonar**.

	Elemento											
	Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
n	74	72	74	77	73	78	78	78	75	74	79	76
>LD (%)	91,4	83,9	92,6	29,6	77,8	3,7	85,2	93,8	49,4	60,5	67,9	81,5
média	151,3	0,643	1,04	1,06	1,99	1,75	5,14	61,7	0,54	2,73	0,68	0,38
DP	125,5	0,306	0,808	0,69	1,20	1,37	2,80	23,4	0,32	1,40	0,88	0,32
mediana	119,7	0,584	0,708	0,816	1,72	1,27	4,75	57,2	0,44	2,43	0,269	0,28
mínimo	2,87	0,119	0,152	0,157	0,29	0,222	0,88	19,9	0,076	0,916	0,060	0,015
máximo	552,2	1,51	3,68	3,17	5,74	6,21	14,0	125,0	1,53	6,35	3,56	1,28

4.3.1. Homens vs. mulheres

Separando os resultados em função do sexo dos indivíduos (tabelas seguintes), obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para o Al, Mn, Cd e Pb.

Tabela 15: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar (µg/g, peso seco): a) Indivíduos do **sexo masculino**.

	Elemento											
	Al*	Mn*	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd*	Pb*
n	45	42	43	46	42	47	46	47	44	45	48	47
>LD (%)	91	84	93	30	78	4	85	94	49	60	68	81
média	191,33	0,70	0,92	1,07	2,05	1,58	4,52	62,09	0,49	2,55	0,79	0,50
DP	137,60	0,31	0,59	0,58	1,20	1,09	2,19	24,09	0,28	1,29	0,90	0,40
mediana	162,17	0,62	0,71	1,04	1,69	1,27	4,05	56,34	0,39	2,31	0,43	0,36
mínimo	10,92	0,19	0,15	0,26	0,45	0,22	0,88	19,98	0,11	0,92	0,07	0,03
máximo	552,25	1,32	2,25	2,65	5,19	3,98	9,57	116,38	1,34	6,01	3,56	1,72

* diferença estatisticamente significativa homens vs. mulheres ($P < 0,05$)

Tabela 16: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$, peso seco): b) Indivíduos do **sexo feminino**.

	Elemento											
	Al*	Mn*	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd*	Pb*
n	29	29	30	30	28	31	30	31	30	29	27	29
>LD (%)	91	84	93	30	78	4	85	94	49	60	68	81
média	89,24	0,54	1,13	0,98	1,58	2,00	5,55	61,00	0,59	3,01	0,21	0,21
DP	68,87	0,24	0,94	0,75	0,62	1,69	2,81	22,60	0,33	1,54	0,09	0,21
mediana	66,87	0,54	0,75	0,78	1,60	1,41	5,13	58,00	0,50	2,70	0,22	0,19
mínimo	2,87	0,12	0,16	0,16	0,29	0,23	1,75	23,09	0,08	0,92	0,06	0,02
máximo	267,17	1,16	3,68	2,93	2,81	6,21	12,82	125,05	1,27	6,35	0,39	0,60

* diferença estatisticamente significativa homens vs. mulheres ($P < 0,05$)

É curioso notar que o Al é um elemento metálico muito abundante na crosta terrestre, estando presente em grandes quantidades no ar atmosférico, e que homens e mulheres têm não só um volume pulmonar significativamente diferente (maior no homem), como um comportamento respiratório também diferente, o que pode justificar a diferença encontrada (níveis de Al significativamente mais elevados nos indivíduos do sexo feminino). Por outro lado, o Mn, o Cd e o Pb são três elementos que apresentam em comum a característica de, no sangue, se encontrarem predominantemente dentro dos eritrócitos. Assim, e sabendo que os homens possuem não só níveis de Hb mais elevados como também valores de hematócrito mais elevados, isso poderá justificar os teores de Mn, Cd e Pb observados nos homens. As diferenças poderão ainda estar relacionadas com a existência de uma maior percentagem de fumadores no subgrupo dos homens.

**Amostras de pulmão.
Comparação Masculino vs Feminino**

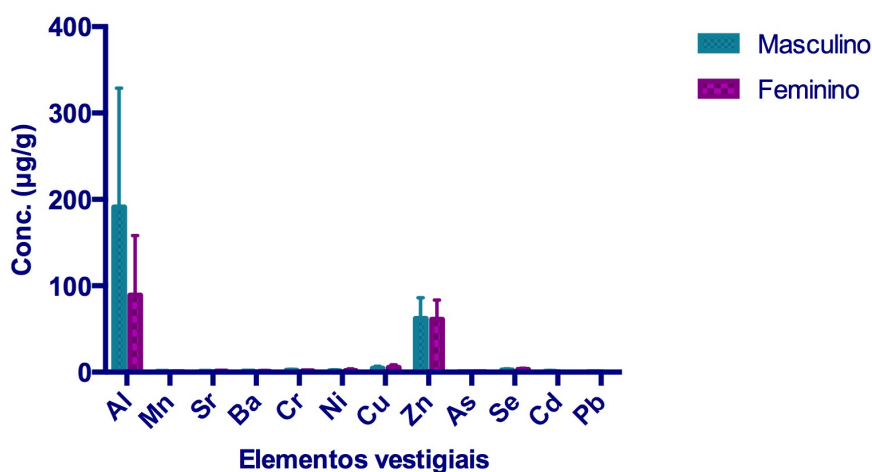


Figura 8: Representação gráfica dos teores ($\mu\text{g/g}$, peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar. **Diferenças entre sexo masculino e sexo feminino.**

É curioso notar ainda que, no plasma sanguíneo, as mulheres tendem a ter níveis mais baixos de Zn e níveis mais elevados de Cu que os homens. Essa mesma diferença entre homens e mulheres também se observou no tecido pulmonar, embora sem atingir significado estatístico.

4.3.2. Variações com a idade

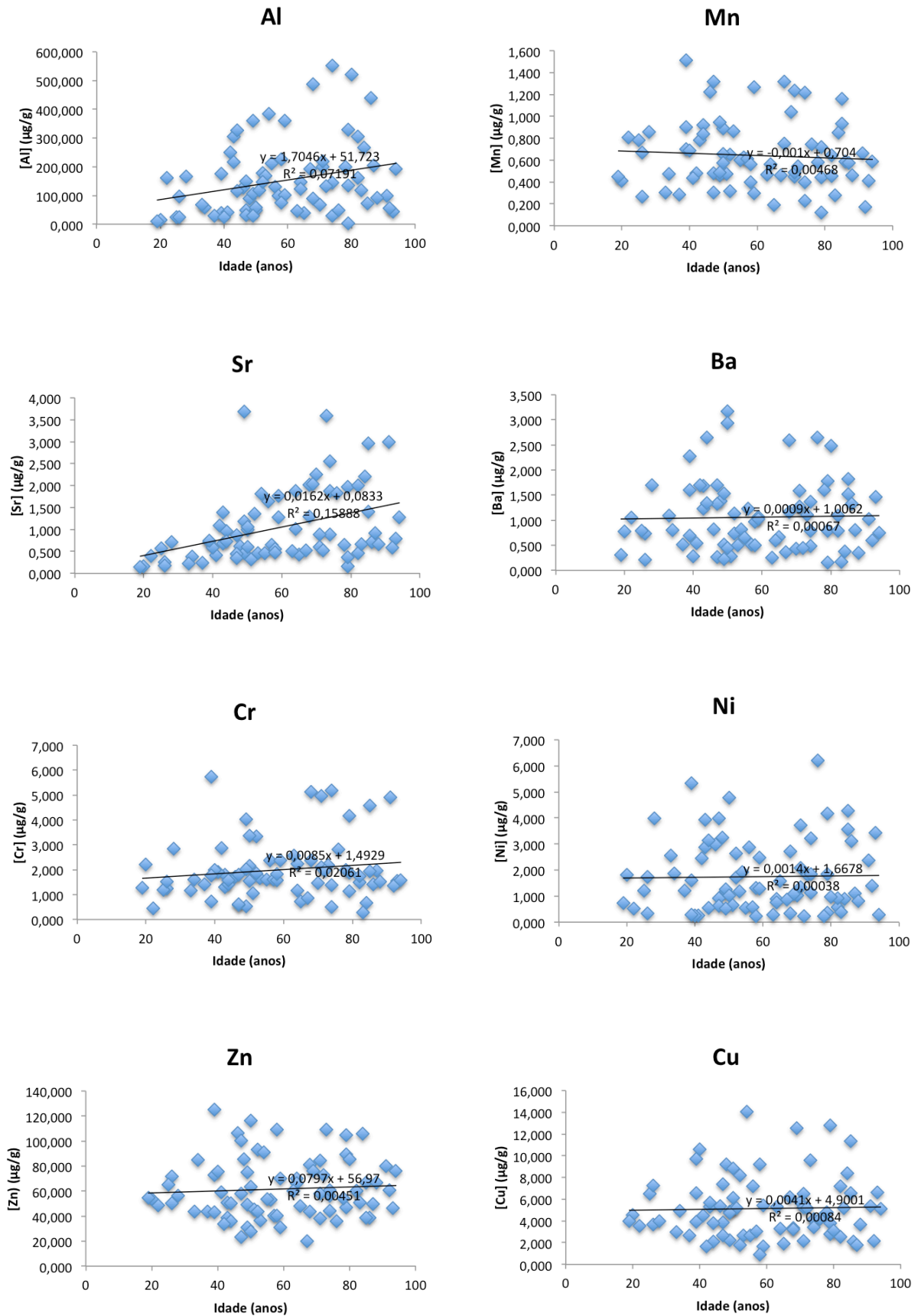
É bem conhecido que com o aumento da idade se observam importantes alterações a nível do organismo humano, incluindo nos valores de muitos parâmetros fisiológicos. A variação com a idade, elemento a elemento, do teor no tecido pulmonar de todos os elementos estudados encontra graficamente representada nas figuras seguintes.

Através da análise por regressão linear (teores no tecido *versus* idade), observou-se uma tendência para um aumento dos teores com a idade na maioria dos elementos estudados, mais acentuado no caso do Al, Sr, As e Se, seguidos do Cr e do Pb.

Pelo contrário, os teores de Mn e de Cd diminuíram com a idade, sendo que no caso do Cd, porém, parecem atingir-se valores muito mais elevados na meia idade (entre os 40-60 anos de idade) relativamente a idades anteriores e posteriores, o que é um comportamento já descrito noutros tecidos (75).

A literatura sobre este assunto é muito escassa. Num estudo realizado por Kollmeier *et al.* (76) verificou-se uma tendência para aumento com a idade dos teores no tecido pulmonar no caso dos metais Ni e Cr, não tendo ocorrido o mesmo com o Cd, o que são observações bastante semelhantes às nossos.

Por outro lado, está descrita uma diminuição com a idade nos níveis plasmáticos de Zn (61), mas aparentemente, de acordo com os resultados por nós obtidos, tal não tem um reflexo sensível nos teores no tecido pulmonar.



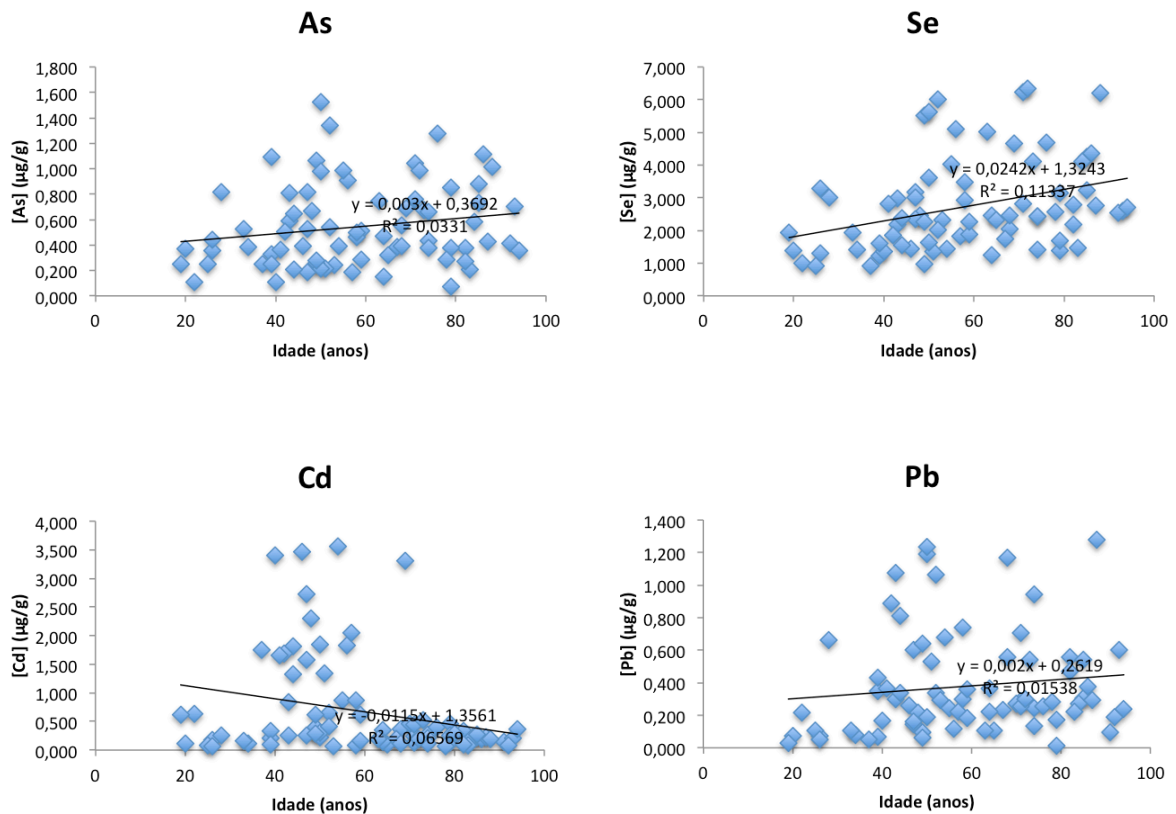


Figura 9: Representação gráfica da variação dos teores (µg/g, peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar em função da idade.

4.3.3. Fumadores vs. não fumadores

Os resultados obtidos separadamente no grupo dos indivíduos fumadores e no grupo dos indivíduos não fumadores encontram-se resumidos nas tabelas seguintes.

Tabela 17: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar (µg/g, peso seco): c) Indivíduos **fumadores**.

	Elemento											
	Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd*	Pb*
n	23	21	23	21	20	23	24	23	22	23	24	23
>LD (%)	91	84	93	30	78	4	85	94	49	60	68	81
média	140,1	0,63	0,86	0,86	1,60	1,48	5,96	63,82	0,50	2,76	1,40	0,42
DP	117,4	0,30	0,62	0,48	0,66	1,17	3,71	25,93	0,28	1,40	1,05	0,36
mediana	106,7	0,63	0,61	0,82	1,54	1,07	4,94	54,73	0,50	2,38	1,10	0,27
mínimo	2,87	0,12	0,15	0,16	0,54	0,23	1,68	30,73	0,08	0,92	0,13	0,02
máximo	383,3	1,32	2,25	1,77	3,37	4,16	14,04	116,4	1,06	5,64	3,56	1,19

* diferença estatisticamente significativa fumadores vs. não fumadores ($P < 0,05$)

Tabela 18: Resumo (estatística descritiva) dos resultados obtidos na determinação de elementos vestigiais no tecido pulmonar ($\mu\text{g/g}$, peso seco): d) Indivíduos **não fumadores**.

	Elemento											
	Al	Mn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd*	Pb*
n	36	33	35	35	35	36	36	36	35	34	36	33
>LD (%)	91	84	93	30	78	4	85	94	49	60	68	81
média	170,3	0,55	1,10	0,95	1,88	1,99	5,03	61,30	0,59	2,95	0,23	0,27
DP	185,5	0,23	0,89	0,52	1,06	1,40	2,46	19,67	0,32	1,60	0,15	0,17
mediana	108,0	0,54	0,71	0,79	1,73	1,77	4,67	60,14	0,52	2,59	0,20	0,24
mínimo	14,13	0,17	0,16	0,17	0,29	0,22	1,75	23,09	0,11	0,92	0,06	0,05
máximo	710,6	1,16	3,59	2,27	4,92	5,32	11,36	109,4	1,34	6,35	0,65	0,66

* diferença estatisticamente significativa fumadores vs. não fumadores ($P < 0,05$)

Genericamente não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos. As duas exceções foram o Pb ($0,42 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$ nos fumadores vs $0,27 \pm 0,17 \mu\text{g/g}$ nos não fumadores) e o Cd, particularmente este último, que se encontrou nos fumadores em níveis cerca de 6 vezes superiores: $1,40 \pm 1,05 \mu\text{g/g}$ vs $0,23 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$.

O Cd é dos metais mais estudados no cigarro. Como se viu atrás, todas as marcas de cigarros possuem teores consideráveis de Cd, sendo que, quando os cigarros são queimados, ele passa em grande extensão para o fumo do cigarro, tornando-se um risco tanto para os fumadores ativos como para os fumadores passivos (52, 70).

Para além do efeito a nível local, deve destacar-se ainda a importância do fumo do cigarro em termos de efeitos sistémicos, resultante do facto de a absorção do Cd ser maior nas células do tecido pulmonar do que no trato gastrointestinal (70).

Quanto ao Pb, a principal forma de exposição é através da inalação de poeiras ou fumo (70). O consumo de tabaco não é visto como uma importante fonte de Pb, no entanto, o tabaco tem mostrado contribuir de forma relevante para o aumento gradual do teor de Pb no organismo (58). O Pb é eliminado do organismo por via urinária, contudo, por se tratar de um processo lento, o Pb vai-se acumulando no organismo (58). Com participação direta no dano do ADN, inibição da síntese e reparação de ADN, produção de ROS e consequente origem de stress oxidativo (70), o Pb é classificado pela IARC como “possivelmente carcinogénico para o humano”.

Kollmeier *et al* (76) justifica o contributo do fumo do cigarro para a acumulação de metais no pulmão através de um duplo mecanismo: i) a intrínseca presença desses metais no tabaco e ii) o facto do fumo do cigarro inibir os mecanismos de defesa existentes a nível pulmonar, nomeadamente a limpeza mucociliar.

Para além do Cd e do Pb, os hábitos tabágicos têm sido associados também a níveis elevados de Al, Mn, Cr e Ni no pulmão (79). Isso, porém, não se verificou neste nosso estudo. O Mn encontrou-se em níveis superiores nos fumadores, mas a diferença não foi significativa. Os restantes três elementos estavam até ligeiramente diminuídos neste subgrupo.

O Cr é um caso particularmente discrepante. Em estudos anteriores foram obtidas concentrações médias de Cr de 1,3 µg/g em não-fumadores e de 4,3 µg/g em fumadores (52, 58). No nosso estudo os valores foram, respetivamente, $1,88 \pm 1,06$ µg/g nos não-fumadores e $1,60 \pm 0,66$ µg/g nos fumadores.

De referir que as comparações entre estudos podem resultar enviesadas pelo facto de as amostras poderem não ter sido colhidas exatamente do mesmo local. Por exemplo, Tsuchiyama verificou que as concentrações mais elevadas de Al, Mn, Cr e Ni ocorriam nas amostras de tecido recolhidas dos lobos superior e médio, provavelmente em reflexo da sua maior capacidade de ventilação (79).

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado uma tendência para alguns elementos, como o Cr e o Ni, se acumularem no tecido pulmonar de indivíduos expostos ocupacionalmente aos mesmos (65). De acordo com os nossos resultados, ambos os metais passam em grande percentagem do tabaco para o fumo. No entanto, como já se referiu, não se observaram teores mais elevados no tecido pulmonar dos fumadores. Neste contexto, importa porém referir que não foi possível obter informação sobre a ocupação profissional dos indivíduos estudados, e uma eventual maior percentagem de indivíduos expostos ocupacionalmente no grupo dos não fumadores pode estar na origem desta discrepância.

O Cu e o Zn desempenham um papel fisiológico fundamental, em particular atuando como cofatores enzimáticos, nomeadamente na Cu,Zn-superóxido dismutase, altamente expressa no tecido pulmonar e envolvida na inibição da produção de radicais livres no citosol (78). Ambos os elementos apresentaram valores médios ligeiramente aumentados nos fumadores, mas sem qualquer significado estatístico.

Por fim uma referência ao Se, que se apresentou ligeiramente diminuído nos fumadores ($2,76 \pm 1,40$ µg/g vs $2,95 \pm 1,60$ nos não fumadores), mas também sem significado estatístico.

Num estudo *postmortem* conduzido por Kraus *et al.* (66), com o objetivo de determinar os “valores normais” de As e Se em tecido pulmonar, os autores também não obtiveram diferenças estatisticamente significativas relacionadas com idade, antecedentes pessoais de doenças pulmonares e hábitos tabágicos.

O Cd e Pb com concentrações médias no tecido pulmonar de $0,680 \pm 0,877 \mu\text{g/g}$ e $0,378 \pm 0,315 \mu\text{g/g}$ respetivamente, foram os únicos elementos que mostraram diferenças estatisticamente significativas quer na idade quer nas populações fumadora e não-fumadora.

A comparação fumadores versus não fumadores encontra graficamente representada na figura seguinte.

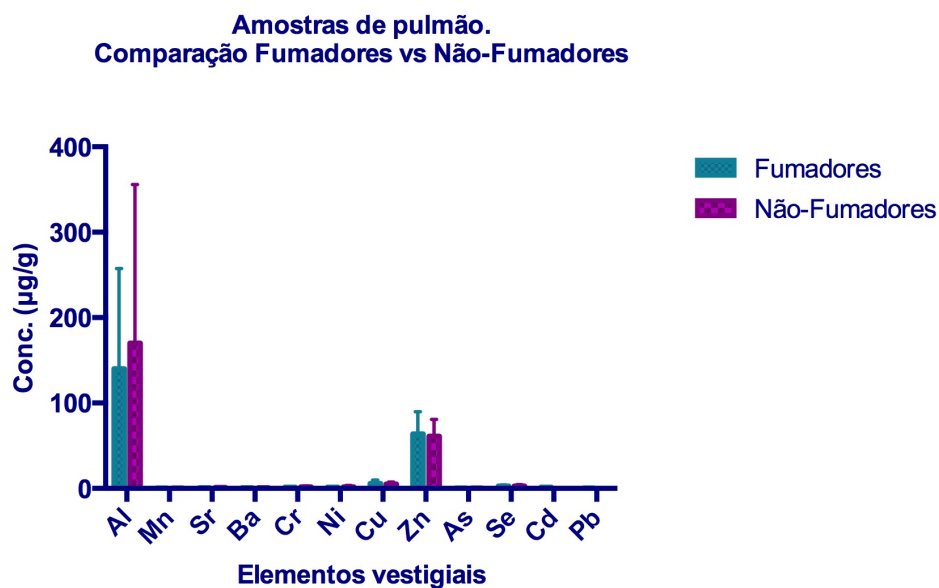


Figura 10: Representação gráfica dos teores ($\mu\text{g/g}$, peso seco) dos elementos vestigiais no tecido pulmonar. **Diferenças entre fumadores e não fumadores.**

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS CONCLUSÕES

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS / CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu evidenciar que:

- O tabaco (e os cigarros) possuem quantidades significativas de diversos elementos vestigiais, incluindo os mais particularmente tóxicos e mais relacionados com as doenças pulmonares e especificamente o cancro do pulmão (As, Cr, Ni, Pb, Cd), na ordem dos 0,5 – 1,5 µg/g, dependendo do elemento.
- Esses elementos passam numa extensão muito importante para o fumo quando os cigarros são consumidos (fumados), estimada em cerca de 8,6% no caso do Pb (valor mínimo) e 71% no caso do Cd (valor máximo).
- O tecido pulmonar revela marcas significativas do hábito tabágico no caso do Pb (níveis cerca de duas vezes superiores aos dos indivíduos não fumadores: $0,42 \pm 0,36$ vs $0,27 \pm 0,17$ µg/g) e do Cd (níveis cerca de seis vezes superiores aos dos indivíduos não fumadores: $1,40 \pm 1,05$ vs $0,23 \pm 0,15$ µg/g).
- Tratando-se de dois elementos metálicos altamente tóxicos e de potencial carcinogénico bem reconhecido, a exposição continuada a estes dois elementos através do consumo do tabaco poderá ter um papel determinante no desenvolvimento de cancro do pulmão.

Nestas circunstâncias parece importante aprofundar estes estudos, incluindo a análise de mais amostras e a análise de mais elementos. Em especial importava ter uma maior informação sobre dados demográficos dos indivíduos estudados, nomeadamente sobre a hábitos alimentares, exposição ambiental e ocupação profissional dos indivíduos estudados, por serem os principais fator que prejudicam a comparação fumadores *versus* não-fumadores.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Imyanitov EN, Kuligina ES, Belogubova EV, Togo AV, Hanson KP. Mechanisms of lung cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2005;2(2):213-23.
2. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health*. 2003;117(3):149-56.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
4. Van Zandwijk N, editor. A Etiology and Prevention of Lung Cancer. Chapter 1. Lung cancer: oncogenesis and prevention. In: Spiro SG, Huber RM and James SM Ed.2009.
5. Wark P, Peto J. *Cancer Epidemiology*. Elsevier Inc. 2008:416-24.
6. Blot W, Fraumeni JJ. Cancers of the lung and pleura. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 1996:637-65.
7. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1955. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1997;50:307-64.
8. Hoffmann D, Hecht S, editors. Advances in tobacco carcinogenesis. *Handbook of Experimental Pharmacology*: In: Cooper CS, Grover PL Ed.Heidelberg (Germany): Springer-Verlag; 1990.
9. Surgeon G. The health consequences of smoking: nicotine addiction. Washington (DC):US Gov Print. 1988.
10. Hecht SS. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(14):1194-210.
11. Wistuba I, Lam S, Behrens C, Virmani A, Fong K, LeRiche J, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89:1366-73.
12. Sekido Y, Fong K, Minna J. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998(1378):21-59.
13. Guengerich F. Cytochrome P450 enzymes. In: Guengerich FP E, editor. *Comprehensive toxicology: biotransformation*. 3: Oxford (UK): Elsevier Science; 1997. p. 37-68.
14. Seymour G. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*. 1998;19(8):1329-32.
15. Gao Y, Zhang Q. Polymorphisms of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. *Mutation research*. 1999;444:441-9.
16. Fernandez-Salguero P, Hoffman S, Cholerton S, Mohrenweiser H, Raunio H, Rautio A, et al. A Genetic Polymorphism in Coumarin 7-Hydroxylation: Sequence of the Human CYP2A Genes and Identification of Variant CYP2A6 Alleles. *The American Journal of Human Genetics*. 1995;57:651-60.
17. London S, Daly A, Leathart J, Navidi W, Iddle J. Lung cancer risk in relation to the CYP2C9*1/CYP2C9*2 genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Pharmacogenetics*. 1996;6:527-33.
18. Amos C, Caporaso N, Weston A. Host factors in lung cancer risk: a review of interdisciplinary studies *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 1992;1:505-13.
19. Kato S. Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 1994;3:515-8.
20. Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, et al. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics*. 1994;4:58-63.
21. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*. 1993;14:1479-81.
22. Rebbeck T. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 1997;6:733-43.

23. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Galán M, Fuentes M, Ramón J, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis*. 1997;18(8):1529-33.
24. Butkiewicz D, Cole K, Phillips D, Harris C, Chorazy M. GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from an environmentally polluted region of Poland: correlation with lung DNA adduct levels. *European Journal Cancer Prevention*. 1999;8:315-23.
25. Saracci R, Boffetta P. Interactions of tobacco smoking with other causes of lung cancer. In: Samet J (Ed) *Epidemiology of lung cancer*. 1994:465-93.
26. IARC. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1-42. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, supplement 7. Lyon: IARC press.1987.
27. Council NR. Committee on health risk of exposure to radon, Board on radiation effects research: health effects of exposure to radon (BEIR VI). Washington, DC: National Academy Press.1998.
28. Boffetta P, Kogevinas M, Westerholm P, Saracci R. Exposure to occupational carcinogens and social class differences in cancer occurrence. IARC Scientific Publications. 1997;138.
29. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation research*. 2009;674(1-2):36-44.
30. Colditz G, Sellers T, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(1):75-83.
31. Tyczynski JE, Bray F, Maxwell Parkin D. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *The Lancet Oncology*. 2003;4(1):45-55.
32. Chow C. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;28:289-98.
33. Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, Piasecka G, Grzelewska-Rzymowska I, Stolarek R, et al. Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. *Respiratory Medicine*. 2000;94:800-5.
34. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*.91(3):S2-S13.
35. Yoo DG, Song YJ, Cho EJ, Lee SK, Park JB, Yu JH, et al. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung cancer*. 2008;60(2):277-84.
36. Masri F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. *Annals of thoracic medicine*. 2010;5(3):123-7.
37. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*. 1996;313:17-29.
38. Esme H, Cemek M, Sezer M, Saglam H, Demir A, Melek H, et al. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology*. 2008;13(1):112-6.
39. Chung F, Chen H, Guttenplan J, Nishikawa A, Hard G. 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal as a potential tumor-indicating agent of lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 1993;14:2073-7.
40. Behera SN, Xian H, Balasubramanian R. Human health risk associated with exposure to toxic elements in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Sci Total Environ*. 2014;472:947-56.
41. IARC. Tobacco smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon (France). 1986:37-375.
42. Hecht S, editor. *Carcinogenic effects of cigarette smoke on the respiratory tract*. Oxford (UK): Elsevier Science; 1997.
43. Hirayama T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *British Medical Journal*. 1981;282:183-5.

44. Brownson RC, Eriksen MP, Davis RM, Warner KE. Environmental tobacco smoke: health effects and policies to reduce exposure. *Annual review of public health*. 1997;18:163-85.
45. Chiba M, Masironi R. Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bulletin of the World Health Organization*. 1992;70 (2):269-75.
46. Das SK. Harmful health effects of cigarette smoking. *Molecular and cellular biochemistry*. 2003;253(1-2):159-65.
47. Nair CR, Davis MM, Das SK. Effect of vitamin A deficiency on pulmonary defense systems of guinea pig lung. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 1988;58(4):375-80.
48. Subramaniam S, Bummer P, Gairola CG. Biochemical and biophysical characterization of pulmonary surfactant in rats exposed chronically to cigarette smoke. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*. 1995;27(1):63-9.
49. Jenkinson SG, Lawrence RA, Burk RF, Gregory PE. Non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity in rat lung: association with lung glutathione S-transferase activity and the effects of hyperoxia. *Toxicology and applied pharmacology*. 1983;68(3):399-404.
50. Burns DM. Cigarette smoking among the elderly: disease consequences and the benefits of cessation. *American journal of health promotion : AJHP*. 2000;14(6):357-61.
51. Burguera JL, Burguera M. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2009;64(6):451-8.
52. McNaught A, Wilkinson A. IUPAC: Compendium of Chemical Terminology: The Golden Book. 2nd ed. ed1997.
53. Strachan S. Trace elements. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2010;21(1):44-8.
54. Fukuda H, Ebara M, Yamada H, Arimoto M, Okabe S, Obu M, et al. Trace Elements and Cancer. *Japan Medical Association Journal*. 2004;47(8):391-5.
55. Bernhard D, Rossmann A, Wick G. Metals in cigarette smoke. *IUBMB life*. 2005;57(12):805-9.
56. Schwartz M. Role of Trace Elements in Cancer. *American Association for Cancer Research*. 1975;35:3481-7.
57. Baumgardt B, Jackwerth E, Otto H, Tolg G. Trace analysis to determine heavy metal load in lung tissue. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 1986;58:27-34.
58. Majewska U, Banas D, Braziewicz J, Gozdz S, Kubala-Kukus A, Kucharczyński M. Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. *Physics in medicine and biology*. 2007;52(13):3895-911.
59. Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Cooley K, Seely A, et al. Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PloS one*. 2011;6(11):1-10.
60. Catalani S, De Palma G, Mangili A, Apostoli P. Metallic elements in lung tissues: results of a meta-analysis. *Acta Biomed*. 2008;79(1):52-63.
61. Jung MC, Thornton I, Chon HT. Arsenic, Cadmium, Copper, Lead, and Zinc Concentrations in Cigarettes Produced in Korea and the United Kingdom. *Environmental Technology*. 1998;19(2):237-41.
62. Kraus T, Quidenus G, Schaller KH. Normal values for arsenic and selenium concentrations in human lung tissue. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2000;38(3):384-9.
63. Matovic V, Buha A, Bulat Z, Dukic-Cosic D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2011;62(1):65-76.

64. Mussalo-Rauhamaa H, Leppanen A, Salmela SS, Pyysalo H. Cigarettes as a source of some trace and heavy metals and pesticides in man. *Archives of environmental health*. 1986;41(1):49-55.
65. Zhang L, Lv J, Sun S. Elements in lung tissues of patients from a high lung cancer incidence area of China. *Biological trace element research*. 2012;148(1):7-10.
66. Mulware SJ. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*. 2012;3(2):85-96.
67. Watanabe T, Fujita H, Koizumi A, Chiba K, Miyasaka M, Ikeda M. Baseline level of blood lead concentration among Japanese farmers. *Archives of environmental health*. 1985;40(3):170-6.
68. IARC. Complete List of Agents Evaluated and their Classification 2006. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
69. Bocio A, Nadal M, Garcia F, Domingo J. Monitoring Metals in the Population Living in the Vicinity of a Hazardous Waste Incinerator. *Biological trace element research*. 2005;106:41-50.
70. De Palma G, Goldoni M, Catalani S, Carbognani P, Poli D, Mozzoni P, et al. Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. *Acta Biomed*. 2008;79(1):43-51.
71. B.Hayes R. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes and Control*. 1996;8:371-85.
72. Cobanoglu U, Demir H, Sayir F, Duran M, Mergan D. Some Mineral, Trace Element and Heavy Metal Concentrations in Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2010;11:1383-8.
73. Jebb M, Barron A. ICP-MS for Trace Metal Analysis. The Connexions Project 2010.
74. Caruso JA, Montes-Bayon M. Elemental speciation studies—new directions for trace metal analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003;56(1):148-63.
75. Alves ASP. Trace elements and cardiovascular diseases. Evidences from the comparative postmortem analysis of tissues. . (dados não publicados). 2014.
76. Kollmeier H, Seemann J, Rothe G, Muller K, Wittig P. Age, sex, and region adjusted concentrations of chromium and nickel in lung tissue. *British Journal of Industrial Medicine*. 1990;47:682-7.

7. ANEXO

I. Registo de Colheita de Amostras

REGISTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS

(Tese de Mestrado: *Cancro do Pulmão, Papel dos Elementos Vestigiais*)

Nº Proc.: _____

Data: ____/____/____

Identificação

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Data de Nasc.: ____/____/____ Idade: _____

Residência: Aldeia ☐ Cidade ☐

Data de Morte: ____/____/____

Causa de Morte: _____

Ocupação Profissional: Atual _____

Anteriores _____

Hábitos Tabágicos: Não Fumador/a ☐ Fumador/a ☐ Ex-Fumador/a ☐

Se **Fumador**, Idade com que iniciou: _____

Nº Cigarros por dia: _____

Se **Ex-Fumador**, Quando deixou de fumar: _____

Consumidor/a de **Álcool**: Não ☐ Sim ☐

Antecedentes Pessoais de Doenças Pulmonares (Pneumonia, Bronquite, DPOC, Asma, outros): Não ☐

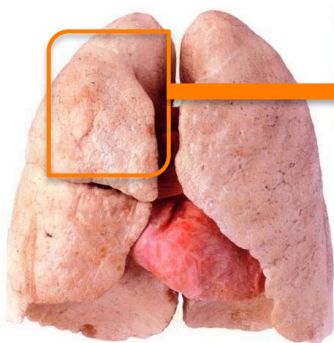
Sim ☐ Qual/Quais: _____

Tratamentos Prévios (Quimioterapia, Radioterapia, outros): Não ☐ Sim ☐

Histórico Familiar de Doenças Pulmonares (Pneumonia, Bronquite, DPOC, Asma, Cancro, outros): Não ☐

Sim ☐ Qual/Quais: _____

PULMÃO



Local de Recolha da Amostra: **Lobo Superior**

Direito

Dimensão da Amostra: **± 0,05 – 0,5 g**

± 0,5 – 1,0 cm

Nº de Amostras: **1**

Observações: _____

Colhido por: _____ Entregue: _____ Recebido: _____

II. Protocolo para Colheita de Amostras

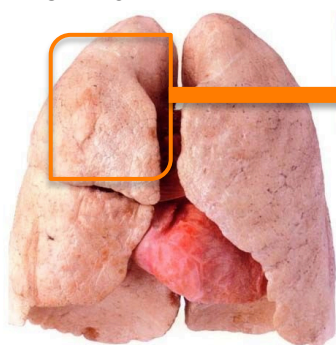
PROTOCOLO PARA COLHEITA DE AMOSTRAS

(Tese de Mestrado: *Cancro do Pulmão, Papel dos Elementos Vestigiais*)

As amostras serão recolhidas durante o exame de autópsia, até 72 horas após a morte, utilizando material de aço inoxidável (em opção titânio). Para auxílio da recolha deverá ser utilizado material de plástico para evitar possíveis contaminações.

Demonstração do Local de Recolha e Dimensão da Amostra:

PULMÃO



Local de Recolha da Amostra: **Lobo Superior**

Direito

Dimensão da Amostra: **± 0,05 – 0,5 g**

± 0,5 – 1,0 cm

Nº de Amostras: **1**

NOTA: Preencher, para cada caso, o REGISTO DE COLHEITA DE AMOSTRA.

Após a recolha, lavar abundantemente a amostra com água ULTRAPURA, para limpar vestígios de sangue e/ou de outro fluídos.

De seguida, colocar as amostras em tubos de plástico, previamente descontaminados e devidamente identificados/etiquetados.

Guardar as amostras no congelador a -20°C.

SELEÇÃO DAS POPULAÇÕES PARA AMOSTRA

- **50 Fumadores/as**
25 Homens e 25 Mulheres, compreendidos em 5 escalões etários:
40-50 anos; 50-60 anos; 60-70 anos; 70-80 anos; >80 anos, idealmente 10 indivíduos (5 Homens e 5 Mulheres) por cada escalão.
- **50 Não Fumadores/as**
25 Homens e 25 Mulheres, compreendidos em 5 escalões etários:
40-50 anos; 50-60 anos; 60-70 anos; 70-80 anos; >80 anos, idealmente 10 indivíduos (5 Homens e 5 Mulheres) por cada escalão.
- Amostras **possíveis** de **tecido pulmonar canceroso**, sexo indiferente e idade ≥40 anos, obtidas a partir de biopsia ou autópsia.